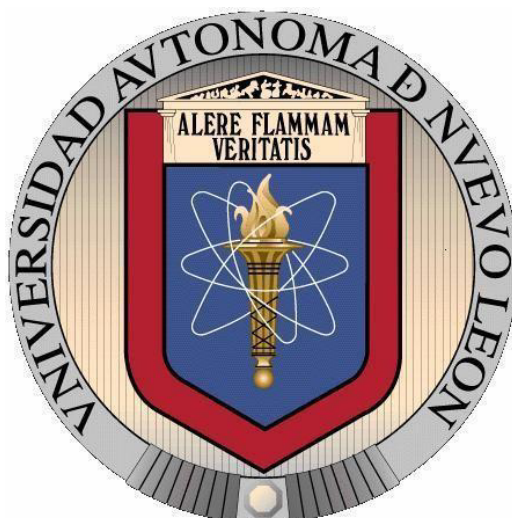


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS (Ag-Fe),
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES
BACTERICIDAS**

Por

QFB ANA LUCÍA PADILLA CRUZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
APLICADA**

JULIO, 2018

BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS (Ag-Fe),
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES
BACTERICIDAS.

Aprobación de tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Presidente

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Secretario

Dr. Carlos Enrique Escárcega González

Vocal

BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS (Ag-Fe),
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES
BACTERICIDAS.

Revisión de tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez

ASESOR

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Carlos Enrique Escárcega González

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Boris Ildusovich Kharissov

COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Aracely Hernández Ramírez

SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

Les agradezco a todos los involucrados en esta etapa de aprendizaje de mi vida profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas y CONACyT por el apoyo económico que me brindaron durante el período en que se desarrolló este trabajo, así como a la escuela de Graduados en Ciencias de la Facultad de Ciencias Químicas por facilitar las instalaciones y equipos necesarios para el mismo.

A mi asesor de tesis, el Dr. Rubén Morones, por darme la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo, por su tiempo y enseñanzas, pero principalmente por confiar en mi al darme todas las libertades de desarrollar este proyecto.

A mi comité tutorial: Dr. Enrique, Dra. María Elena y Dr. Boris, por su apoyo y tiempo brindado para evaluar mis avances y compartirme sus conocimientos.

A todos los profesores de las diferentes orientaciones de este posgrado por compartirme de sus conocimientos dentro y fuera de las aulas.

A mis compañeros de laboratorio de Biotecnología 3: Jav, Paco, Albert, Alex, Jordy, Ximena y Lili por sacarme de apuros, siempre estar ahí y hacer más llevaderas las horas nocturnas en el laboratorio.

A mi mamá, por comprarme las plantas para este proyecto y cuidarlas durante el mismo; por estar a mi lado y motivarme siempre. A mi papá que me enseñó que la educación es nuestra mayor herramienta y es uno de los motivos por los cuales siempre me seguiré preparando y aprendiendo cosas nuevas. A ambos: porque sin su educación no sería lo que soy hoy en día.

A Christian Abreu, por siempre estar ahí para mí y acompañarme en esta

etapa de mi vida, por entender cuando no podía salir porque se acercaba el seminario departamental y más aún la entrega de la tesis, cuando las citas se convertían en charlas sobre bacterias y cosas del proyecto. Por siempre darme ánimos cuando sentía que no avanzaba en mis pruebas y por todo el apoyo que me ha brindado en estos años que hemos tenido el gusto de compartir.

A las chavas de mi generación Juli, Paty y Mary, por esas tardes no planeadas de hora feliz en el Starbucks donde nos poníamos al día.

Y no menos importante, le agradezco a cada miembro de la empresa Nanomateriales que me apoyó y alentó en estos dos años.

Finalmente, le agradezco a Dios, que me ha dado la fortaleza para lograr lo que me propongo.

¡Gracias!

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis padres.

*Por ofrecerme siempre lo mejor e inculcarme a luchar por mis sueños... hoy
pueden sentirse orgullosos de este logro que juntos construimos.*

Por todas sus enseñanzas, siempre serán mi motivación más grande.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	12
INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Microorganismos resistentes	12
1.2 Generalidades sobre mecanismos de acción de los antibióticos vs nanopartículas.....	15
1.2.1 Estrés oxidativo	17
1.2.2 Iones metálicos disueltos.....	18
1.2.3 La interacción de las NPs con la barrera celular.	18
1.3 Generalidades sobre mecanismos de síntesis de nanopartículas.....	20
CAPÍTULO 2.....	22
ANTECEDENTES	22
CAPÍTULO 3.....	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
3.1 Hipótesis.....	29
3.2 Objetivo General.....	29
3.3 Objetivos Específicos	29
CAPÍTULO 4.....	31
METODOLOGÍA.....	31
4.1 Materiales, reactivos y equipo.....	31
4.2 Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	33
4.3 Metodología de síntesis de nanopartículas monometálicas y bimetálicas.....	33
4.4 Caracterización de las nanopartículas	35
4.5 Prueba rápida de magnetismo.....	36
4.6 Identificación de la fase de crecimiento exponencial de las cepas bacterianas a utilizar.....	37
4.7 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las nanopartículas metálicas y bimetálicas incluidas en el estudio.....	37
4.8 Determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de las nanopartículas metálicas y bimetálicas incluidas en el estudio.....	40
4.9 Incorporación de nanopartículas en esmaltes cerámicos.....	40
4.10 Determinación de la actividad antibacterial de superficies cerámicas con nanopartículas bimetálicas contra un cultivo de <i>E.coli</i> ATCC 8739	41
4.11 Manejo y disposición de residuos	42
CAPÍTULO 5.....	43
RESULTADOS	43
5.1 Resultados de la síntesis.....	43

5.2.	Resultados de la caracterización de las nanopartículas.....	44
5.3.	Resultados prueba rápida de magnetismo.....	50
5.4	Incorporación de nanopartículas a esmalte	51
5.5.	Resultados de pruebas biológicas	52
5.5.1.	Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 en medio MH	52
5.5.2	Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	53
5.5.3	Determinación de las CMB de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	55
5.5.4	Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 en medio MH.....	56
5.5.5	Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	57
5.5.6	Determinación de las CMB de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	59
5.5.7	Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente en medio MH.....	60
5.5.8	Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> resistente	61
5.5.9	Determinación de las CMB de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> resistente	63
5.5.10	Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 en medio MH	64
5.5.11	Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.....	65
5.5.12	Determinación de las CMB de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.....	67
5.5.13	Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 en medio MH	67
5.5.14	Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	69
5.5.15	Determinación de las CMB de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	70
5.5.16	Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 en medio MH	71
5.5.17	Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	72
5.5.18	Determinación de las CMB de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	74
5.5.19	Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente en medio MH....	75
5.5.20	Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente	76

5.5.21	Determinación de concentraciones mínimas bactericidas de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente.....	78
5.5.22	Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 en medio MH.	79
5.5.23	Determinación de las CMI _s de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	80
5.5.24	Determinación de las CMB _s de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	82
5.5.25	Curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> en medio YM	83
5.5.26	Determinación de las CMI _s de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Candida albicans</i>	84
5.5.27	Determinación de las CMB _s de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en <i>Candida albicans</i>	85
5.6	Determinación de la actividad antibacterial de superficies cerámicas con nanopartículas bimetálicas contra un cultivo de <i>E.coli</i> ATCC 8739	86
CAPITULO 6.....		88
DISCUSIÓN DE RESULTADOS		88
CAPÍTULO 7.....		97
CONCLUSIONES		97
CAPÍTULO 8.....		99
ANEXOS		99
CAPÍTULO 9.....		102
REFERENCIAS		102
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO		113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	53
Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	57
Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Staphylococcus aureus</i> resistente	61
Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	65
Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	69
Tabla 6. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	72
Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente.....	76
Tabla 8. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	80
Tabla 9. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>Candida albicans</i>	84
Tabla 10. Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de acción de NPs en células de bacterias	19
Figura 2. Membrana de <i>E.coli</i> con nanopartículas de Ag	24
Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis de las NPs de plata, hierro y bimetálicas.....	44
Figura 4. Espectro Infrarrojo de las NPs de plata, hierro y bimetálicas vs extracto reductor y estabilizante de <i>Gardenia jasminoides</i>	45
Figura 5. Espectro de Raman de las BNP's	46
Figura 6. Micrografías de BNP's y distribución de tamaño de partícula de las micrografías.....	47
Figura 7. Espectros XRD de las NPs bimetálicas, Ag y Fe.....	48
Figura 8. Micrografía electrónica de transmisión de barrido de campo oscuro anular de ángulo alto de las BNP's	49
Figura 9. Espectro de dispersión de Energía de Rayos X de las BNP's.....	50
Figura 10. Prueba rápida de magnetismo	51
Figura 11. Incorporación de nanopartículas a esmalte	52
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	53
Figura 13. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	54
Figura 14. Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	55
Figura 15. Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	57
Figura 16. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	58
Figura 17 Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	59

Figura 18. Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente.....	61
Figura 19. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> resistente	62
Figura 20. Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Staphylococcus aureus</i> resistente.....	63
Figura 21. Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.....	64
Figura 22. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.....	65
Figura 23. Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.....	67
Figura 24. Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	68
Figura 25. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	69
Figura 26. Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	71
Figura 27. Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	72
Figura 28. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	73
Figura 29. Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	74
Figura 30. Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente	76
Figura 31. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente	77
Figura 32. Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente	78

Figura 33. Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	80
Figura 34. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	81
Figura 35. Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	82
Figura 36. Curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i>	83
Figura 37. Monitoreo de la determinación de concentración mínima inhibitoria de nanopartículas bimetálicas en <i>Candida albicans</i>	84
Figura 38. Determinación de la concentración mínima bactericida de nanopartículas de Ag y Bimetálicas en <i>Candida albicans</i>	85
Figura 39. Espectro UV-Vis de síntesis química de Nanopartículas Bimetálicas Fe-Ag por Carroll <i>et al.</i>	99
Figura 40. TEM de alta resolución de Nanopartículas bimetálicas por Ruiz <i>et al.</i> comparadas con las sintetizadas en este proyecto donde podemos visualizar su similitud en morfología	100
Figura 41. Nanopartículas bimetálicas Fe-Ag en diferentes concentraciones evaluadas contra una amplia gama de microorganismos por Sharma <i>et al.</i>	101

TABLA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
μL	Microlitro
Ag	Plata
AgNO_3	Nitrato de plata
ATCC	American Type Culture Collection
BNPs	Nanopartículas Bimetálicas
C	Carbono
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
células/ mL	Células por mililitro
cm	Centímetros
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
-COOH	Grupo carboxilo
Core/Shell	Núcleo/ coraza
Cr	Cromo
Cu	Cobre
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	Y otros
Fe	Hierro
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Nitrato de hierro nonahidratado
$\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{ZnO}$	Óxido ferroso o Magnetita – Óxido de Zinc
FIC	Concentración Inhibitoria Fraccionada
FTIR	Infrarrojo con Transformadas de Fourier
g/L	Gramos por litro
h	Horas
IR	Infrarrojo
KBr	Bromuro de Potasio
LPS	Lipopolisacárido

M	Molar
μm	Micrómetro
Mg	Magnesio
MgO	Óxido de Magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPa	Mega Pascal
NaBH ₄	Boro Hidruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
-NH ₂	Grupo amino
nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas
nzv	Nanopartícula cero valente
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH	Potencial de Hidrógeno
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
-SH	Grupo mercapto
STC	Soya Trypticaseína
TEM	Microscopía electrónica de Transmisión
™	Marca no registrada
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV-Vis	Ultra Violeta- Visible
XRD	Difracción de Rayos X

RESUMEN

Ana Lucía Padilla Cruz

Fecha de graduación: Julio, 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: Biosíntesis de Nanopartículas Bimetálicas (Ag-Fe), caracterización y evaluación de sus propiedades bactericidas.

Número de páginas: 113

**Candidata para el grado de
Maestría en Ciencias con
Orientación en
Microbiología Aplicada**

Área de estudio: Procesos Microbiológicos.

Actualmente la resistencia bacteriana es un tema relevante de investigación al seguir incrementándose la cantidad de microorganismos resistentes. La obtención de materiales con distintas propiedades específicas como las antibacteriales que le den valor agregado son de gran utilidad en estos casos y más aún si son obtenidos con una metodología verde. Lo anterior haciendo referencia a los 10 principios de la química verde.

En el presente trabajo se utiliza la combinación de dos metales de transición en forma de nanopartícula: Ag y Fe para evaluar su actividad bacteriostática y/o bactericida contra distintas cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, algunas de ellas resistentes a distintos antibióticos. El objetivo principal es demostrar la sinergia de los metales antes mencionados al disminuir las concentraciones utilizadas en los ensayos. Mediante la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas se comprobó el efecto en los distintos microorganismos estudiados.

Utilizando el extracto de la planta *Gardenia jasminoides* se sintetizaron mediante métodos biológicos o “síntesis verde” nanopartículas bimetálicas Ag-Fe las cuales fueron evaluadas contra distintos microorganismos encontrando que en la mayoría de los casos se mostraba una sinergia o potencialización al combinar los elementos mencionados. Lo anterior haciendo referencia a que las Fe-NPs sintetizadas no poseían propiedades antimicrobianas y las Ag-NPs sí, y al combinar dichos metales en la reacción de síntesis y evaluar las sus propiedades mostraron un efecto antibacterial

igual o mayor que el de los metales estudiados de manera individual.

El uso de este tipo de materiales es principalmente en la remediación de aguas contaminadas, por lo que planteamos su uso alternativo como agente antibacterial al probar su eficacia contra una amplia variedad de microorganismos, entre ellos Gram positivos, Gram negativos y una levadura.

Por último, se puede concluir que al utilizar la combinación de diferentes metales de transición como son el Fe (III) y la Ag (I) se logra una sinergia al requerir una menor concentración de ambos en forma de nanopartícula para inhibir el crecimiento de distintos microorganismos, incluso de bacterias resistentes. Con esto, se tiene la posibilidad de considerar este material como tecnología alternativa en el tema de resistencia bacteriana.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Microorganismos resistentes

Un informe reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que, la resistencia a antimicrobianos (RAM) se produce cuando los microorganismos sufren diversos cambios al verse expuestos a ciertos agentes. Esto se debe a que la bacteria posee habilidades naturales de adquirir material genético foráneo como genes de resistencia, lo que le ha permitido seguir adaptándose a entornos selectivos principalmente por el uso indiscriminado de los antibióticos ¹⁻³.

Además, el uso inapropiado de agentes y medicamentos antimicrobianos acelera este fenómeno de resistencia, el cual se da de manera natural en las comunidades microbianas, y las prácticas inapropiadas para el control de las infecciones propician la propagación de las cepas que han adquirido la resistencia a los diversos agentes antimicrobianos ⁴.

Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las

infecciones persisten en el huésped, causando infecciones difíciles de tratar y por lo tanto también se incrementa el riesgo de propagación a otras personas, además de convertirse en un problema a gran escala que afecta de manera significativa la salud pública al reducir considerablemente la posibilidad de tratar infecciones de manera efectiva, de incrementar el riesgo a presentar complicaciones y de un desenlace fatal ^{1,5,6}.

Esta es la razón por la cual se ha generado la necesidad de desarrollar alternativas que ayuden a combatir la transmisión de infecciones producidas por bacterias resistentes.

En el caso de los hospitales, las infecciones se producen por el contacto del paciente con tres posibles fuentes: su propia flora, los patógenos presentes en otros pacientes o en el personal sanitario y, por último, patógenos presentes en el ambiente hospitalario. Desde hace más de 20 años se estima que el 20-40% de las infecciones se adquieren de forma horizontal de otros pacientes o personal y el 20%, del ambiente ^{7,8}.

Se ha reportado que las infecciones aparecen después de 48 horas de estadía hospitalaria ⁹, indicando que el lugar de la estancia es donde se encuentran los puntos críticos de infección; siendo transmitidas entre el personal, pacientes e individuos que tengan acceso al lugar.

Dadas estas estadísticas, la empresa Nanomateriales S.A de C.V ha observado un nicho de oportunidades debido a que estudios indican que una gran cantidad de infecciones se relacionan con la atención sanitaria y que éste es un problema mundial ¹⁰.

En la actualidad, se han desarrollado nuevos antibióticos, pero su

introducción en el mercado es muy costosa. El ritmo de descubrimiento de nuevos complejos antibióticos está desacelerándose. La mayoría de las innovaciones consisten en rediseñar los complejos existentes y no en descubrir nuevos mecanismos ¹¹.

Por consecuente al tener una problemática de alto impacto y las herramientas para combatirla, la estrategia es continuar la búsqueda de nuevos antibióticos naturales así como desarrollar modificaciones sintéticas de antibióticos existentes para recuperar eficacia ³.

Dentro de esta búsqueda se estudia el uso de partículas metálicas de tamaño nanométrico, ya que muestran propiedades físicas y químicas únicas ¹². Sin embargo, las nanopartículas bimetálicas (BNPs) han recibido mayor atención debido a que estas partículas están compuestas de dos elementos metálicos y se les atribuyen ventajas no solo a la interacción electrónica entre los metales, sino también a la compleja estructura de la nanopartícula que forman, obteniendo efectos sinérgicos en algunas aplicaciones ¹³.

Las nanopartículas (NPs) se usan cada vez más para atacar a las bacterias como una alternativa a los antibióticos. La nanotecnología puede ser particularmente ventajosa en el tratamiento de infecciones bacterianas. Los ejemplos incluyen la utilización de NPs en recubrimientos antibacterianos para dispositivos implantables y materiales medicinales para prevenir la infección y promover la curación de heridas, en sistemas de administración de antibióticos para tratar enfermedades, en sistemas de detección bacteriana para generar diagnósticos microbianos y en vacunas antibacterianas para controlar infecciones bacterianas ¹⁴.

La búsqueda de nuevas tecnologías y métodos de síntesis de nanopartículas metálicas es una necesidad creciente debido a que se espera mejorar la eficiencia de los ya existentes, así como la minimización de sus efectos en el medio ambiente. Algunos de los métodos de síntesis de NPs de plata y hierro involucran el uso de residuos agroindustriales de alto potencial reductor como los son: el almidón de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) y de malanga (*Colocasia esculenta*); garantizando que este método no utiliza productos con alto impacto en el medio ambiente ¹⁵.

Basado en lo anterior, el presente trabajo busca diseñar y explorar el desarrollo de nanopartículas metálicas usando metales que podrían mostrar un efecto antibacterial sinérgico al incorporarlos a superficies. El proceso incluirá la síntesis, caracterización y aplicación de las partículas bimetálicas para evaluar sus propiedades antimicrobianas en superficies cerámicas, ya que ésta es un área que no ha sido ampliamente explorada.

1.2 Generalidades sobre mecanismos de acción de los antibióticos vs nanopartículas

Varios estudios han proporcionado evidencia directa de que el uso generalizado de antibióticos ha llevado a la aparición de cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos. De hecho, las súper bacterias, que son resistentes a casi todos los antibióticos se han desarrollado recientemente debido al abuso de antibióticos. Los estudios han demostrado que estas bacterias tienen un gen de superresistencia llamado NDM-1 ¹⁶. Los principales grupos de antibióticos actualmente en uso tienen tres objetivos bacterianos: la

síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas y la replicación del ADN. Desafortunadamente, la resistencia bacteriana puede desarrollarse contra cada uno de estos modos de acción.

Los mecanismos de resistencia incluyen la expresión de enzimas que modifican o degradan antibióticos, tales como β -lactamasas y transferasas ¹⁷, modificación de componentes celulares, como la pared celular en resistencia a vancomicina y ribosomas en resistencia a tetraciclina ^{18,19} y expresión de bombas de fusión, que proporcionar resistencia simultánea contra numerosos antibióticos ²⁰.

La mayoría de los mecanismos de resistencia a los antibióticos son irrelevantes para las nanopartículas porque su modo de acción es el contacto directo con la pared celular bacteriana, sin la necesidad de penetrar en la célula; esto aumenta la probabilidad de que las NPs serían menos propensas a promover la resistencia en bacterias que los antibióticos. Por lo tanto, la atención se ha centrado en materiales nuevos y emocionantes basados en NPs con actividad antibacteriana ¹⁴.

Los mecanismos antibacterianos de las NPs son poco conocidos, pero los mecanismos actualmente aceptados incluyen generalmente a uno de los tres modelos: inducción de estrés oxidativo ²¹, liberación de iones metálicos ²², o los mecanismos no oxidativos ²³. Los mecanismos de acción simultáneos múltiples contra los microorganismos requerirían múltiples mutaciones génicas simultáneas en la misma célula bacteriana para que se desarrollara la resistencia antibacteriana; por lo tanto, es difícil que las células bacterianas se vuelvan resistentes a las NPs ¹⁴.

Estos tres tipos de mecanismos pueden ocurrir simultáneamente y los principales procesos subyacentes a los efectos antibacterianos de las NPs son los siguientes: 1) disrupción de la membrana celular bacteriana; 2) generación de especies reactivas de oxígeno (ROS); 3) penetración de la membrana celular bacteriana y 4) inducción de efectos antibacterianos intracelulares, que incluyen interacciones con ADN y proteínas ^{14,24}.

Las NPs deben estar en contacto con las células bacterianas para lograr su función antibacteriana. Las formas de contacto aceptadas incluyen la atracción electrostática ²⁵, fuerzas de Van der Waals ²⁶, el receptor-ligando ²⁷ y las interacciones hidrófobas ²⁸. Las NPs también cruzan la membrana bacteriana y se reúnen a lo largo de la ruta metabólica, lo que influye en la forma y función de la membrana celular. A partir de entonces, las NPs interactúan con los componentes básicos de las células bacterianas, como ADN, lisosomas, ribosomas y enzimas, lo que provoca estrés oxidativo, alteraciones heterogéneas, cambios en la permeabilidad de la membrana celular, trastornos del equilibrio electrolítico, inhibición enzimática, desactivación de proteínas y cambios en la expresión de genes ^{29,30}.

1.2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo inducido por ROS es un importante mecanismo antibacteriano de las NPs. ROS es un término genérico para moléculas e intermedios reactivos que tienen un fuerte potencial redox positivo. En circunstancias normales, la producción y eliminación de ROS en las células bacterianas son equilibradas. Por el contrario, con una producción excesiva

de ROS, el equilibrio redox de la célula favorece la oxidación. Este estado desequilibrado produce estrés oxidativo, que daña los componentes individuales de las células bacterianas ^{31,32}.

Se ha confirmado que el estrés oxidativo es un contribuyente clave para cambiar la permeabilidad de la membrana celular, lo que puede provocar daños en la membrana de las células bacterianas ³³. Un número creciente de estudios también ha demostrado que las ROS desempeñan un papel clave en la interacción entre el ADN y las células bacterianas ¹⁸ Las NPs pueden producir ROS por diferentes mecanismos. La generación de ROS degrada los componentes activos que son responsables de mantener las funciones fisiológicas y morfológicas normales del microorganismo ³⁴.

1.2.2 Iones metálicos disueltos

Los iones metálicos se liberan lentamente del óxido metálico y se absorben a través de la membrana celular, seguido por la interacción directa con los grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos, como grupos mercapto (-SH), amino (-NH) y carboxilo (-COOH), dañando la actividad enzimática, cambiando la estructura celular, afectando los procesos fisiológicos normales, y finalmente inhibiendo el microorganismo ³⁴.

1.2.3 La interacción de las NPs con la barrera celular.

Las paredes celulares y las membranas son barreras defensivas importantes para la resistencia bacteriana al ambiente externo. En particular, la pared celular bacteriana juega un papel importante en el mantenimiento de

la forma natural de la bacteria. Los componentes de la membrana celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas producen diferentes vías de adsorción para las NPs ³⁵. LPS es una estructura única de la pared celular de bacterias Gram negativas que proporciona una región con carga negativa que atrae a las NPs.

Generalmente, las NPs pueden atacar las células de las bacterias a través de múltiples mecanismos, como se observa en la Figura 1.

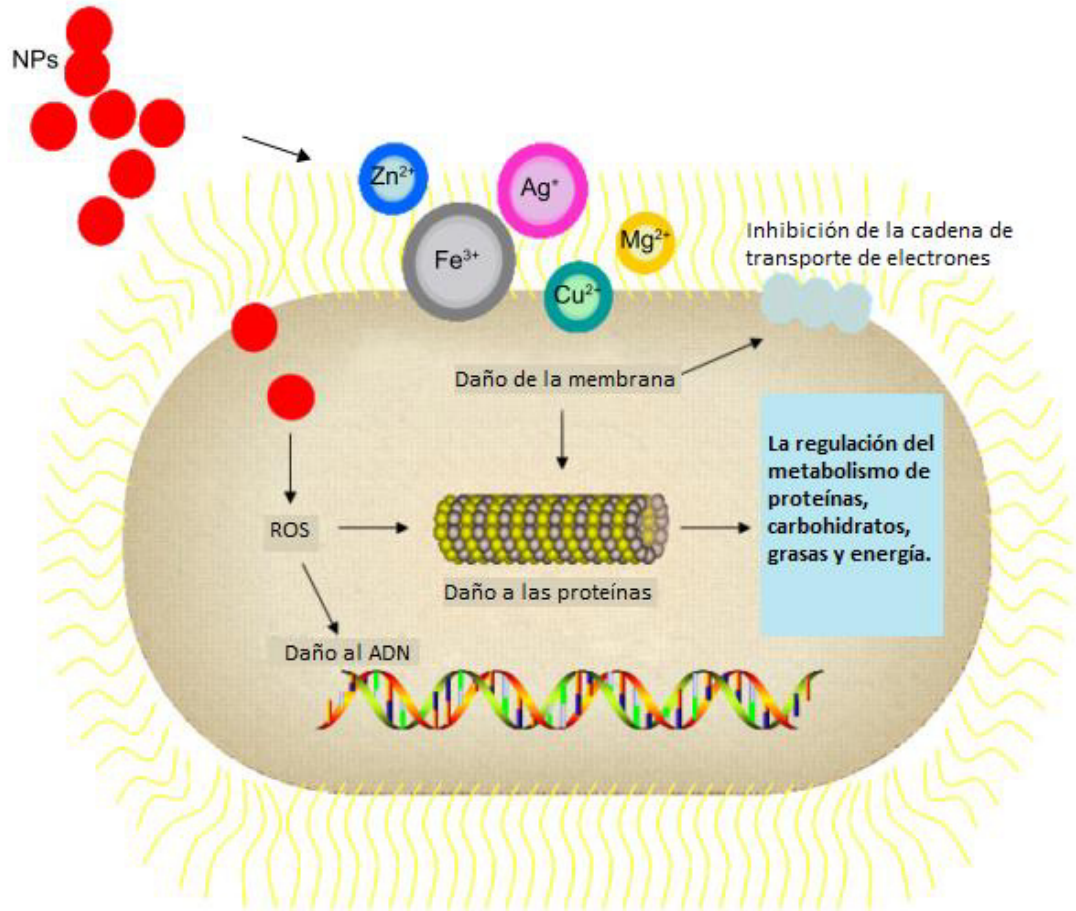


Figura 1. Mecanismos de acción de NPs en células bacterianas ¹⁴.

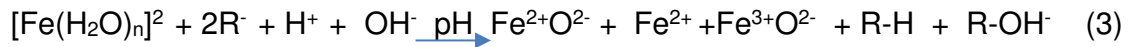
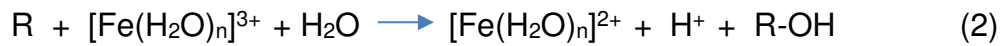
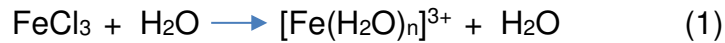
1.3 Generalidades sobre mecanismos de síntesis de nanopartículas

El mecanismo real de síntesis de nanopartículas por organismos vivos aún no está claro, sin embargo, los estudios muestran que las enzimas producidas a partir de bacterias y hongos y biomoléculas, especialmente compuestos fenólicos en productos vegetales, pueden producir nanopartículas metálicas por medio de una síntesis verde ³⁶⁻³⁸. Del mismo modo, la combinación de biomoléculas químicamente complejas, por ejemplo, enzimas, aminoácidos, proteínas, vitaminas y polisacáridos, y ácidos orgánicos tales como citratos, pueden actuar como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de nanopartículas ³⁹.

El mecanismo detrás de la formación de nanopartículas metálicas mediadas por extractos vegetales no se ha definido claramente hasta ahora. Diversos componentes de la planta son ricos en metabolitos secundarios y responsables de la síntesis de nanopartículas metálicas. Los metabolitos secundarios incluyen los polifenoles, flavonoides, ácido tánico, terpenoides, ácido ascórbico, ácidos carboxílicos, aldehídos y amidas. Muchos azúcares reductores se encuentran comúnmente en las plantas, y su presencia se confirma mediante la técnica espectroscópica IR en estudios indirectos ⁴⁰.

Los fitoquímicos en los extractos de plantas poseen propiedades redox ideales que permiten la reducción eficiente de los precursores de metales para la conversión en sus correspondientes nanopartículas metálicas. En un estudio Becerra *et al.* utilizaron el tanino de la alfalfa. De acuerdo con la suposición, los taninos asociados a la alfalfa, derivados en taninos radicales "R" causan la reducción del metal bajo la influencia del pH ⁴¹. El proceso de

bio-reducción puede inducirse de la siguiente manera:



Por otra parte, respecto al método más empleado para la obtención de nanopartículas bimetálicas es el de micro-emulsión o micela reversa. El método permite controlar la forma y el tamaño de las nanopartículas a sintetizar. Generalmente se utiliza una fase oleosa, un surfactante y un co-surfactante como agente estabilizador de las interfaces de las nanopartículas. Ya formada la micela, se introducen los reactantes dentro de los reactores donde se lleva a cabo la reacción. Las nanopartículas formadas se estabilizan debido a que la superficie se recubre con moléculas estabilizantes en el medio acuoso no polar ^{13,42}.

Es de vital importancia explorar un proceso más confiable y sostenible para la síntesis de nanomateriales. La viabilidad económica, la sostenibilidad ambiental y la adaptabilidad social, así como la disponibilidad de recursos locales son motivo de preocupación en la producción de nanomateriales. Los procesos de producción basados en nanotecnología verde operan sin la intervención de productos químicos tóxicos, contribuyendo así a la sostenibilidad ambiental mencionada.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

En los últimos años, se ha mostrado gran interés a la síntesis de nanopartículas metálicas con el fin de explorar sus propiedades y aplicaciones especiales.

Investigaciones y una serie de logros recientes ofrecen la posibilidad de generar nuevos tipos de nanomateriales con diseño de superficie y propiedades específicas. Esto permite seguir desarrollando nuevas tecnologías que logran cubrir las necesidades de la sociedad con numerosas aplicaciones, ya sea físicas, biológicas, biomédicas y farmacéuticas ^{12,43}.

Recientemente, Ashmore *et al.* estudiaron la incorporación de nanopartículas de plata a matrices poliméricas con el fin de atribuirle propiedades antibacteriales al incorporar 10% del material en uno de sus ensayos ⁴⁴. En la aplicación en materiales cerámicos para obtener la misma propiedad se ha reportado utilizar el 5 o 10% del aditivo antibacterial en la pieza para obtener resultados aceptables ^{45,46}.

Paralelo al tema de nanopartículas de metales y el diseño de nanomateriales, dentro del equipo de investigación del laboratorio de Biotecnología 3 de ésta Facultad, se llevó a cabo un estudio sobre el “Uso de metales de transición en ensayos combinatorios metal-antibiótico para la re-sensibilización de bacterias resistentes”, y se encontró que diversos metales de transición poseen el efecto inhibitorio del crecimiento microbiano utilizando bajas concentraciones. Posteriormente, se comprobó que presentan un efecto bactericida cuando se usan en combinación con la plata a las concentraciones que presentan el efecto inhibitorio por sí solos ⁴⁷. Actualmente se realizan estudios de estos metales de transición en forma de nanopartícula para conocer el comportamiento de los microorganismos ante dichas combinaciones nanopartícula-antibiótico.

Adicional al uso de sales de metales y de nanopartículas de plata, también se han buscado aplicaciones para las nanopartículas bimetálicas que pudieran potencializar la propiedad antibacterial. Sin embargo, existe la posibilidad de combinar dichas sales con antibióticos que es la base del estudio realizado en el laboratorio 3 de Biotecnología recién mencionado.

También se han estudiado sus mecanismos de acción al ser evaluadas como antibacteriales. El caso de las nanopartículas de plata ha sido estudiado por microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual ha ayudado a comprender la acción biocida de este material a nanoescala. Los resultados confirman que células de *Escherichia coli* tratadas fueron dañadas, ya que se muestra la formación de "hoyos" en la pared celular de las bacterias al acumularse las nanopartículas de plata en la membrana bacteriana. Una

membrana con una morfología tal exhibe un aumento significativo de la permeabilidad, lo que resulta en la muerte de la célula ⁴⁸.

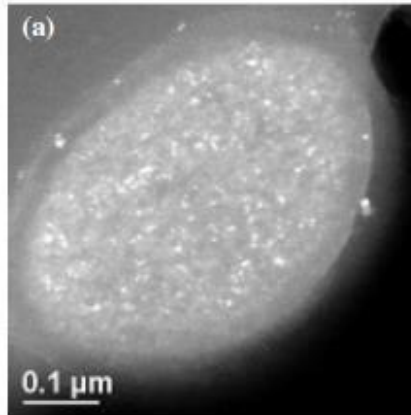


Figura 2. Membrana de *E.coli* con nanopartículas de plata. Se muestra una presencia considerable de nanopartículas de plata en la membrana y en el interior de *E. coli* ¹².

En el caso de la plata, un efecto sinérgico antimicrobiano se consigue cuando las nanopartículas de plata son hibridadas con otras nanopartículas de metales u óxidos que actúan como una concha o un núcleo para formar BNPs ⁴⁹. Dicho efecto se ha comprobado en partículas bimetálicas estudiadas como Ag-Cu ⁵⁰, Au-Ag ⁵¹ y Ag-Cu-Zn ⁵², a su vez, la combinación de estas partículas con antibióticos incrementa la actividad antimicrobiana ^{50,53}. En el caso de las nanopartículas de hierro (Fe-NPs), estudios recientes han indicado el potencial de las Fe-NPs para la remediación ambiental. Materiales a escala nanométrica como filtrantes, catalizadores y biocidas como las nanopartículas de metales y óxidos metálicos, se emplean actualmente para la remediación de contaminantes de aguas residuales. Entre estas nanopartículas metálicas, las nanopartículas de hierro tienen ventajas prometedoras que pueden combatir la contaminación ambiental ^{54,55}.

Diferentes nanopartículas bimetálicas se han sintetizado incluyendo nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ZnO}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ a las cuales se les ha encontrado propiedades antimicrobianas muy interesantes ⁵⁶⁻⁵⁸.

Manahan en el libro “*Green Chemistry and the Ten Commandments of Sustainability*”, introduce a los conceptos básicos de “Química Verde” y a su vez proporciona una visión general de la disciplina emergente de la química verde junto con los principios químicos fundamentales necesarios para comprender esta ciencia ⁵⁹.

Saif *et al.* ⁴⁰ recopilan información sobre distintos tipos de nanopartículas de hierro, así como los diferentes agentes bioquímicos utilizados para la reducción. Con ello se obtienen diferentes tamaños y morfologías de nanopartículas destacando que el uso que más resalta es una aplicación en pro del medio ambiente.

Varios investigadores han informado sobre la síntesis verde de nanopartículas usando diversos extractos de plantas. La biosíntesis de estas nanopartículas se ha realizado principalmente utilizando extracto de té verde, que es un recurso barato y local. Hoag *et al.* sintetizaron nanopartículas zero vales de hierro (nZVI) utilizando extracto de té verde (*Camellia sinensis*) que contiene una gama de polifenoles. Sin la adición de ningún tensioactivo o polímero, las nanopartículas estables se obtuvieron a temperatura ambiente. Los polifenoles en la planta actúan como un agente reductor y como agente limitador, lo que da como resultado partículas de hierro estables con propiedades únicas con un diámetro de 5-10 nm ⁶⁰.

En otro estudio, Shahwan *et al.* adoptaron el mismo procedimiento para

la síntesis de nanopartículas de hierro con poca modificación. Utilizaron la solución de cloruro de hierro 0,10 M para el té verde en proporciones de volumen de 2:3. Después de esto, se añadió solución de NaOH 1,0 M hasta que el pH fue de 6,0 y la formación de nanopartículas se marcó por la aparición de un precipitado negro intenso. Las partículas de hierro se recolectaron evaporando agua de la solución. Las nanopartículas obtenidas (40-60 nm) se emplearon luego como un catalizador para la degradación de los colorantes azul de metileno y naranja de metilo ⁶¹. La producción de Fe-NPs con diferentes tamaños y propiedades se debe a un cambio en el procedimiento de síntesis, y la relación más importante es la de extracto - sal.

Sharma *et al.* ⁶² sintetizaron nanopartículas bimetálicas Fe-Ag a través de un método de sonicación en donde se tenían las nzvi y después se agrega una solución de AgNO₃ a diferentes concentraciones, posteriormente la mezcla es sometida a sonicación, seguida de agitación a 150 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos. El objetivo de remover fosfatos del agua e inactivar microorganismos por nanopartículas de hierro es contribuir a nueva información en el tema. En este estudio se demostró que las BNPes son capaces de remover el fosfato del agua. Sin embargo, la plata no desempeña un efecto análogo en la eliminación de éste.

En el tema antimicrobiano, estas nanopartículas se probaron contra 9 microorganismos, los valores de CMI se encontraban entre 100-500 g/L (100,000 - 500,000 ppm), en el caso de las muestras estudiadas las Fe-NPs no mostraron efecto antimicrobiano y las nanopartículas Ag-Fe inhibieron significativamente el crecimiento de las bacterias estudiadas.

Distintos investigadores como Fakhri, A. *et al.* y Sheikholeslami, S. *et al.* utilizaron las pruebas de determinación de concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida y la concentración inhibitoria fraccionada (FIC) al evaluar el efecto antibacterial de extractos y nanopartículas basados en los procedimientos “Estándares para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana” (NCCLS) ^{63,64}.

Otros autores estudiaron el efecto de potenciación de algunas nanopartículas, así como la sinergia de combinaciones entre las mismas e incluso con distintos antibióticos obteniendo resultados positivos al utilizar bajas concentraciones de los elementos evaluados ⁶⁵⁻⁶⁷.

Devatha *et al.* ⁶⁸ sintetizaron nanopartículas de hierro usando diferentes extractos por síntesis biológica para el tratamiento de aguas residuales domésticas. Utilizaron como sal precursora sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y extractos de *Mangifera indica*, *Murraya Koenigii*, *Azadirachta Indica* y *Magnolia Champaca*, además de utilizar D-sorbitol como agente estabilizante. Dichos autores describen los diferentes tamaños obtenidos y que estos se deben a los diferentes componentes del extracto que los hace diferentes mencionando particularmente fenoles, flavonoides, alcaloides y que estos mediante el proceso de reducción forman un recubrimiento sobre la nanopartícula confirmada en los espectros IR. La prueba experimental de remoción de fosfatos indicó una alta capacidad de las nanopartículas sintetizadas de eliminar los fosfatos de las aguas residuales domésticas.

En el 2010 Carroll *et al.* ⁶⁹ sintetizaron nanopartículas de Fe y Ag, core

/Shell por síntesis química y llevaron a cabo la caracterización de material. Ellos utilizaron FeSO_4 , AgNO_3 y NaBH_4 como agente reductor. No le dieron ninguna aplicación a su material.

Ruiz *et al.* ⁷⁰ sintetizaron nanopartículas bimetálicas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ por vía química indicando que el hierro se oxida en el momento de la reducción de la plata. Se obtuvieron nanopartículas en promedio de 20 nm y no se estudió ninguna aplicación para el material, solo su caracterización.

En otro estudio Wei *et al.* ⁷¹, sintetizaron Fe-NPs con éxito utilizando extractos de hojas de *Eichhornia crassipes*, y las condiciones de extracción óptimas para preparar el extracto fueron exploradas. Las nanopartículas fueron amorfas con diámetros en el rango de 20-80 nm En el proceso de síntesis, los polifenoles, flavonoides, azúcares reductores y los ácidos orgánicos existentes en los extractos de hojas fueron responsables de la bio-reducción de iones de hierro y estabilización de las Fe-NPs. Los resultados indicaron que Cr (VI) era reducido a Cr (III) por las nanopartículas con alta eficiencia. El método de síntesis verde utilizado fue factible, proporcionando una ruta prometedora para la utilización de recursos de *Eichhornia crassipes*.

Esto nos da la pauta para suponer que diversas nanopartículas en combinación con la plata poseen la capacidad de mejorar el efecto de este metal y tener una actividad potenciada o sinérgica considerando en su síntesis una metodología verde y la posterior caracterización del material.

Así en el presente estudio se abordará la estrategia presentada anteriormente: la síntesis de BNPs para su posterior estudio contra diversos microorganismos, con el objetivo de comprobar la existencia de sinergia.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Las nanopartículas bimetálicas de Ag-Fe tienen un efecto bactericida mayor que el efecto de las partículas monometálicas.

3.2 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanopartículas bimetálicas para evaluar su propiedad antimicrobiana mediante pruebas microbiológicas.

3.3 Objetivos Específicos

1. Sintetizar partículas metálicas y después llevar a cabo una incorporación para la obtención de partículas bimetálicas.
2. Obtener las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y las Concentraciones Mínimas Bactericidas de las nanopartículas de Ag, Fe y a su vez de las nanopartículas bimetálicas.
3. Caracterización del material.

4. Realizar cinéticas de crecimiento de las cepas estudiadas en contacto con las nanopartículas bimetálicas para evaluar su comportamiento.
5. Desarrollar una metodología para la determinación de superficies antibacteriales porosas (cerámicos) tomando como referencia la norma ISO22196:2011.
6. Evaluar el efecto inhibitorio de las nanopartículas bimetálicas en distintas cepas de estudio utilizando superficies cerámicas recubiertas por la combinación de NPs para evaluar su comportamiento.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

4.1 Materiales, reactivos y equipo

Para las diversas pruebas a realizar en el presente proyecto se utilizó el siguiente material: Cajas Petri de vidrio marca KIMAX, matraces Erlenmeyer 125, 250 y 500 mL marca PYREX y KIMAX, tubos para cultivo marca HACH y PYREX, tubos de ensayo de 15 y 50 mL marca Corning, placas de 96 pocillos marca Corning, celdas para colorímetro de 10 mL marca Brand, tubos para colorímetro de 10 mL marca La Motte, micropipetas de 2-20, 20- 200 y 100-1000 μ L con sus respectivas puntillas marca Eppendorf.

De los reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto se utilizaron: caldo y agar soya tripticaseína (STC) caldo y agar Mueller Hinton (MH) y agar bacteriológico, ambos de la marca BD, Bioxon. Las sales de metales utilizadas son $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y AgNO_3 , el primero adquirido en Reactivos y Equipos y el segundo proporcionado por el almacén general de reactivos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Los siguientes equipos, que se encuentran en los laboratorios de Biotecnología 2 y 3 ubicados en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, se utilizaron para el desarrollo de las pruebas incluidas en el presente estudio: incubadora estática y con agitación, balanza analítica, campana de flujo laminar, autoclave, refrigerador y congelador Norlake, espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus, lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific) y concentrador marca Thermo Fisher Scientific Modelo Integrated speedvac.

En las instalaciones de la incubadora de Nanotecnología ubicada en el Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT) se encuentra el Espectrofotómetro Infrarrojo marca Shimadzu modelo IRAfinity-1 con un rango de medición entre 500 y 4000 cm^{-1} .

En el Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT) ubicado dentro del Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT) se encuentra el espectrofotómetro RAMAN modelo DXR RAMAN Thermo Scientific.

Dentro de las instalaciones del Centro De Investigación En Química Aplicada (CIQA) se cuenta con el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) modelo FEI-TITAN 80-300 kV operado a un voltaje de aceleración de 300 kV. Las imágenes de alta resolución (HRTEM) y el estudio de espectrometría de dispersión de energía (EDS), se hacen el mismo equipo.

4.2 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 y *Candida albicans* se obtuvieron por cortesía del laboratorio de Biotecnología 1 de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Las cepas farmacorresistentes *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología 3. *P. aeruginosa* presenta resistencia a Amikacina, Aztreonam, Cefepime, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Gentamicina, Levofloxacino, Norfloxacino, Ofloxacino, Tetraciclina y Tobramicina; y *S. aureus* a Ampicilina y Penicilina.

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fueron proporcionadas por la empresa Nanomateriales S.A de C.V durante el tiempo de colaboración.

Todas las pruebas realizadas con bacterias se realizaron en medio MH (BD, Bioxon), mientras que las pruebas con *Candida albicans* se realizaron en medio YM (BD, Bioxon).

4.3 Metodología de síntesis de nanopartículas monometálicas y bimetálicas

Se recogieron hojas frescas de plantas de *Gardenia jasminoides* del jardín de una vivienda particular ubicada en el municipio de Guadalupe, N.L., México. Estas hojas se lavan suavemente con agua desionizada y se dejan secar a temperatura ambiente para después ser trituradas con ayuda de un mortero.

Se pesaron 2 g del pulverizado de *Gardenia jasminoides* y se colocaron en 60 mL de agua destilada. Posteriormente se les aplicó agitación con un agitador magnético durante dos horas. El extracto obtenido fue filtrado con papel filtro de 1 micra y utilizado en una proporción 2:1:1 para las nanopartículas bimetálicas y 1:1 para las monometálicas con respecto a la sales de los metales precursores ⁷².

Las concentraciones utilizadas fueron 0,01 M y 0,02 M para la solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ y la solución de AgNO_3 respectivamente. Se preparó una solución stock de AgNO_3 de concentración 100 mM a partir de su sal. En el caso del $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ las soluciones se hicieron minutos antes de utilizarlas debido a la sensibilidad de este metal a oxidarse. Las soluciones fueron preparadas en matraces volumétricos y después guardadas en frascos con capacidad de 200 mL.

La síntesis biológica se llevó a cabo añadiendo en un tubo Falcon TM 12.5 mL de la solución de AgNO_3 0.020 M y 12.5 mL de la solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0.01 M, posterior a esto se colocó un agitador magnético dentro del tubo y se puso a calentar a baño maría hasta alcanzar una temperatura cercana a los 60 °C. Alcanzada esta temperatura, se adicionaron 25 mL del extracto filtrado antes mencionado obteniendo una relación 2:1:1 y se mantuvo esta reacción en agitación constante y calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 80 °C, la cual se mantuvo durante 1 hora.

Es importante mencionar que se esperaba un cambio de coloración característica (negra para la reducción del hierro o café para la reducción de la plata) al contacto del extracto con la solución de la mezcla de sales que

indica la reducción de uno o ambos metales.

La reacción obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, desechando el sobrenadante y continuando con 5 lavados con etanol al 70% para eliminar el excedente de materia orgánica con su respectivo ciclo de centrifugado.

El producto se secó a temperatura ambiente durante 1 día y/o con ayuda del concentrador hasta obtener un polvo.

Las condiciones de síntesis se mantuvieron al escalar la reacción, siendo el volumen máximo obtenido 400 mL.

4.4 Caracterización de las nanopartículas

Se utilizaron diversas técnicas para caracterizar las muestras sintetizadas. Se determinó el espectro de absorción en el UV-Vis en el equipo Thermo Scientific modelo MultiskanGO en el rango de longitud de onda de 250–600nm, utilizando como muestra para el análisis el último lavado de NPs dispersado en agua desionizada.

Se elaboraron pastillas de Bromuro de potasio (KBr) para incorporar los materiales a analizar por espectroscopia infrarroja. Se empleó un espectrómetro Shimadzu modelo IRAfinity-1 con un rango de medición entre 650 y 4000 cm^{-1} .

Se obtuvo muestra en polvo del extracto utilizado para la síntesis en el concentrador para posteriormente analizarlo por FTIR y RAMAN, y así obtener información sobre sus grupos funcionales.

El espectro RAMAN de las NPs fue medido mediante el DXR RAMAN Thermo Scientific proporcionando información sobre las interacciones entre las nanopartículas y el extracto.

La composición elemental, morfología y tamaño de las nanopartículas se obtuvieron mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión modelo FEI-TITAN 80-300 kV operado a un voltaje de aceleración de 300 kV. Las fotos de alta resolución (HRTEM) y el estudio de espectrometría de dispersión de energía (EDS), se hacen en el mismo equipo.

El análisis de imágenes TEM se analizó mediante el uso del software ImageJ desarrollado por el National Institute of Health de EE.UU.⁷³.

Adicional a los análisis anteriormente mencionados, se llevó a cabo un análisis de Rayos X mediante el equipo Difractómetro de Rayos X para polvos Marca Siemens, modelo D-5000 ubicado en el laboratorio de Materiales I de la División de Estudios de Posgrado de la FCQ bajo las condiciones: 2θ de 5 - 90° con tamaño de paso de 0.05 ° y tiempo de paso de 1 segundo en el cual se analizaron las muestras y se compararon con su base de datos para conocer la composición de las NPs.

4.5 Prueba rápida de magnetismo

La prueba consistió en utilizar un imán para producir un campo magnético, el cual atrae cierto tipo de metales u objetos ferrosos.

En este caso se utiliza un imán en forma de círculo el cual tiene contacto directo con las NPs y si estas se adhieren a él se consideran magnéticas.

4.6 Identificación de la fase de crecimiento exponencial de las cepas bacterianas a utilizar

Para identificar a qué tiempo la cepa comienza su fase de crecimiento exponencial se preparó un cultivo overnight, a partir de una colonia en cultivo sólido de agar MH (BD, Bioxon) se tomó una asada (de una colonia aislada), se sembró por estría en tres campos y se dejó incubando por 16-20 horas a 37°C.

Del cultivo overnight se tomó una asada y se inoculó en un tubo estéril con 10 mL de medio fresco (Caldo MH), el cual se dejó incubar a 37°C en una incubadora con agitación orbital a una velocidad de 150 rpm. Posteriormente, se tomaron 20 µL de la suspensión de bacteria en 180 µL de caldo MH que fueron colocados en una caja estéril de 96 pocillos y se monitoreó la OD de este cultivo durante 24 horas continuas a 600 nm (OD600) en un lector de placas Thermo Scientific modelo MultiskanGO para identificar la fase de crecimiento exponencial y obtener la curva de crecimiento del microorganismo que será reportada en los resultados.

4.7 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las nanopartículas metálicas y bimetálicas incluidas en el estudio

La determinación de las CMI se desarrolló tomando como base la metodología reportada por Wikler M ⁷⁴, el Manual de ensayos antimicrobianos ⁷⁵ y Andrews ⁷⁶ con algunas modificaciones, llevando a cabo los ensayos para las nanopartículas de plata, hierro y las nanopartículas bimetálicas plata-

hierro en placas de 96 pocillos con fondo plano Costar (Corning).

Se prepararon soluciones de las nanopartículas monometálicas y bimetálicas de estudio a 1000 ppm para estos ensayos. Una vez preparadas estas soluciones, en el primer y segundo pocillo de prueba se agregó la cantidad necesaria de cada metal para lograr una concentración de 500 ppm en un volumen final de 200 μ L, utilizando medio fresco para completar el volumen. El pocillo uno solamente tendría la solución estudio y caldo fresco como control negativo a crecimiento y a partir del segundo pocillo se realizaron las diluciones correspondientes, tomando 100 μ L de cada pocillo y pasándolos al siguiente, logrando que la siguiente concentración fuera 1/2 de la anterior, repitiéndose este último paso las veces necesarias para que las concentraciones a probar de cada tipo de nanopartícula sean 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.81, 3.90, 1.95 y 0.97 ppm una vez agregados los 100 μ L del inóculo. Lo anterior hasta el pocillo diez, del cual se desechan los últimos 100 μ L para tener el volumen de 200 μ L deseado.

En el pocillo 11 se tiene un control positivo a crecimiento que contiene 100 μ L de caldo fresco y 100 μ L del microorganismo a evaluar al igual que las diluciones del ensayo. El pocillo 12 contiene únicamente 200 μ L de caldo fresco como control de esterilidad.

Para inocular cada pocillo de prueba con cada uno de los microorganismos estudiados (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* cepa resistente, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* cepa resistente,

Pseudomonas aeruginosa DSM 50071 o *Candida albicans*) se dejó crecer un cultivo overnight (cultivo de 16 h) a 37°C-150 rpm en su medio correspondiente (sección 4.2), de este cultivo se realizó una dilución 1:250 en medio fresco y se incubó hasta que se alcanzó una densidad óptica (OD₆₀₀ de 0,2 ±0,02); ajustando con medio fresco si es necesario para alcanzar un rango de concentración celular entre 10⁷ -10⁸ células / mL en el caso de las bacterias y de 10⁵ células/mL en el caso de la levadura de estudio, esta última con una absorbancia de 0.3 corroborado por cuenta viable en ambos casos. Posteriormente se realizó el ajuste con NaCl al 0.85% para tener una concentración final de cada microorganismo de 5x10⁵ células/mL y finalmente se agregaron 100 µL (1:2) de esta dilución para dar una concentración final ~2-3x10⁵ células/mL en un volumen final de 200 µL en cada pocillo de prueba y se dejó incubar a 37°C con agitación de 150rpm por 24 horas. El número de células se determinó previamente mediante el método de recuento en placa medido por diluciones en serie.

Después de 24 h de incubación a 37 ° C, se midieron las OD del control y el inóculo tratado con las diferentes concentraciones de NPs. Seguidamente determinamos que la CMI para cada una de las nanopartículas de los metales de transición correspondía a la concentración a la que no se observó crecimiento (OD₆₀₀). Se considera la CMI la concentración correspondiente al pocillo que contiene la concentración más baja de NPs a la cual no se observa crecimiento utilizando el lector de microplacas Multiskan GO. O bien, es decir, de izquierda a derecha el ultimo pocillo que no presenta turbidez ⁷⁷.

Cada prueba se realizó por triplicado, con sus correspondientes controles de crecimiento y esterilidad. La lectura de las placas para el análisis de los resultados se llevó a cabo por espectrofotometría en un lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific).

4.8 Determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMBs) de las nanopartículas metálicas y bimetálicas incluidas en el estudio

Después de obtener las concentraciones mínimas inhibitorias descritas en la sección 4.7 se procede a seleccionar los pocillos que corresponden a 2 veces la CMI (un pocillo antes de la CMI), la CMI y el control positivo a crecimiento. De cada pocillo seleccionado se realizan 7 diluciones, la primera 20 μL en 180 μL del caldo correspondiente. Después se toman 20 μL y se diluyen en 180 μL de caldo nuevamente y así sucesivamente hasta llegar a 1×10^7 células/mL. De cada dilución se toman 10 μL de cada dilución y se siembran en placa en el medio correspondiente y se dejan incubar a 37°C por 24 horas en incubadora estática.

En el caso de los controles se siembran 5 diluciones más considerando que el objetivo es cuantificar el número de UFC.

4.9 Incorporación de nanopartículas en esmaltes cerámicos

La construcción de las pastillas cerámicas se hizo conforme la siguiente lista, tomando como base lo reportado por Hasmaliza *et.al*⁴⁶.

- Secado del polvo de porcelana (100°C 3-4 horas)

- Fresado (5 horas)
- Tamizado (125 μ m)
- Granulación (7-8% de agua)
- Tamizado (600 μ m y 212 μ m)
- Polvo presionando a 120MPa
- Sinterizado a 1000 ° C

Para la preparación del esmalte se utiliza un esmalte comercial con viscosidad estándar y posterior a ello se siguen los siguientes puntos:

- Añadir las NPs a la concentración deseada
- Agitar/ Dispersar
- Recubrimiento por inmersión (10 segundos)
- Sinterización (1140 °C, 1 min)

4.10 Determinación de la actividad antibacterial de superficies cerámicas con nanopartículas bimetálicas contra un cultivo de *E.coli* ATCC 8739

La suspensión del microorganismo a estudiar se prepara conforme la sección 4.7. Posterior a obtener una concentración celular en un rango de $\sim 10^7$ - 10^8 UFC/mL a una OD₆₀₀ de 0,2 \pm 0,02 ajustando con medio fresco si es necesario. Posteriormente se realizó el ajuste con NaCl al 0.85% para tener una concentración final de cada microorganismo de $\sim 1.5 \times 10^7$ UFC / mL.

La evaluación de las piezas debe de realizarse por triplicado, considerando la evaluación de un estándar. Se colocan las 3 piezas

previamente desinfectadas con alcohol al 70% dentro de una caja Petri estéril sobre una base, ya que se agregan de 5-8 mL de agua para mantener la humedad. Posteriormente se inoculan 100 μ L de la suspensión de bacterias con concentración de $\sim 1.5 \times 10^7$ UFC / mL sobre cada superficie cerámica a evaluar y finalmente se coloca la caja dentro de la incubadora a 37°C durante 24 horas.

En las muestras que contienen NPs, se recolecta el inóculo a las 24 horas utilizando hisopos estériles para muestrear la superficie y en el caso de las piezas estándar se deben muestrear 3 piezas en el tiempo 0, y 3 en el tiempo 24. El método dilución en serie se usó para determinar el número de células viables después de la exposición de la superficie del cerámico los microorganismos. Posteriormente se vació el agar MH en las cajas Petri con inóculos y se pusieron a incubar a 37 ° C durante 24h.

4.11 Manejo y disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización del proyecto de investigación fueron gestionados de acuerdo con las características de estos, siguiendo los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas utilizando los recipientes proporcionados por este departamento, en base a la Norma PR-CLB-SRR-000.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Resultados de la síntesis

Se obtuvieron NPs de plata, hierro y bimetálicas Ag-Fe en solución al llevar a cabo la reacción descrita en metodología.

Las Ag-NPs presentaron una coloración café característica al transcurrir el tiempo de reacción de este metal de transición con el extracto de *Gardenia jasminoides*.

En el caso de las Fe-NPs, al contacto del extracto de *Gardenia jasminoides* con la solución del metal, ésta de un color amarillo paja pasó a una coloración negra intensa al instante.

Las BNPs presentaron la misma coloración negra de las Fe-NPs.

Posterior al secado, se procedió a pesar las NPs obtenidas en forma de polvo con una coloración café oscura con destellos metálicos para el caso de plata y una coloración negra para las Fe-NPs y las

bimetálicas. Se obtuvieron 1.82 mg /mL, 4.74 mg /mL y 1.41 mg /mL de reacción de NPs de plata, hierro y bimetálicas respectivamente.

5.2. Resultados de la caracterización de las nanopartículas

La reacción se monitoreó por espectrofotometría UV-Vis. Los espectros de absorción obtenidos del análisis de las nanopartículas sintetizadas Ag-NPs, Fe-NPs, BNPs se muestran en la figura 3. Se puede visualizar la absorción característica de las Ag-NPs con una amplia distribución de tamaño por la amplitud del pico en color verde. En el caso de las Fe-NPs y BNPs, no se visualiza un pico de absorción, teniendo como referencia que absorben en un rango de 250 a 400nm.

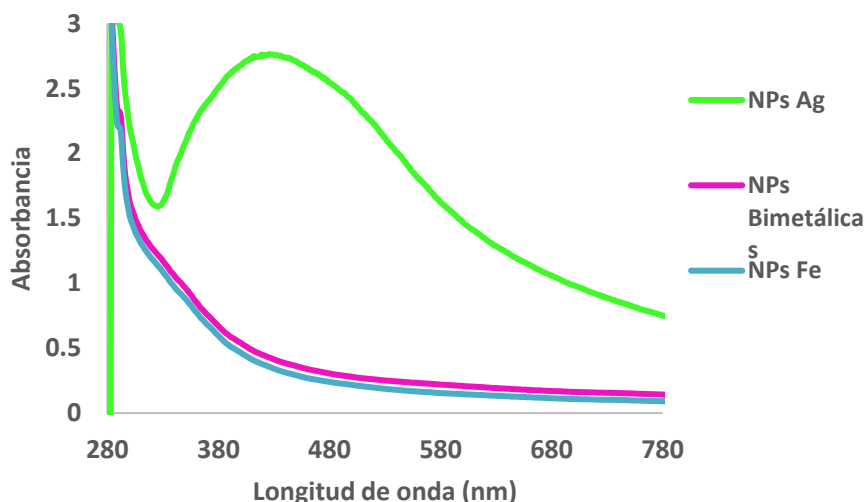


Figura 3. Espectro de absorción UV-Vis de las NPs de plata, hierro y bimetálicas

El análisis FTIR se llevó a cabo para identificar los grupos funcionales que corresponderían a posibles biomoléculas contenidas en el extracto de

Gardenia jasminoides responsables de la reducción de nanopartículas de Ag-Fe y el recubrimiento de estas (figura 4). La amplia banda de absorción en la región de 3600 a 3000 cm^{-1} representa el estiramiento del grupo OH y otro pico a 2950 cm^{-1} representa el estiramiento C-H. La banda en 1640 cm^{-1} se puede asignar a la vibración C=O, así como la banda en 1430 puede asignarse a las vibraciones C=C. El pico a 1080 cm^{-1} corresponde a las vibraciones C-O.

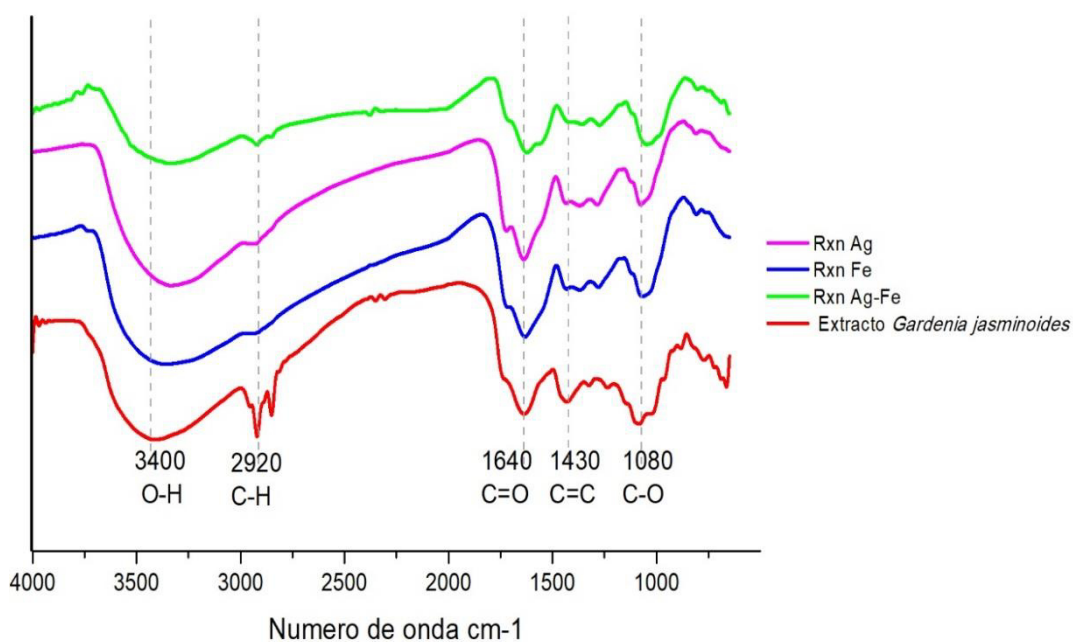


Figura 4. Espectro Infrarrojo de las NPs de plata, hierro y bimetalicas vs extracto reductor y estabilizante de *Gardenia jasminoides*

Lo que se observa en el espectro IR señala que el extracto se encuentra recubriendo las distintas nanopartículas al mostrar una gran similitud en las bandas, y de acuerdo con los grupos funcionales que corresponden a dichas bandas, se puede inferir que las biomoléculas

responsables de la reducción son polifenoles ⁷⁸.

En la figura 5, se muestra el espectro obtenido por espectrometría Raman, se observan picos de absorbanca entre 1300 y 1500 cm^{-1} , los cuales son característicos de anillos aromáticos.

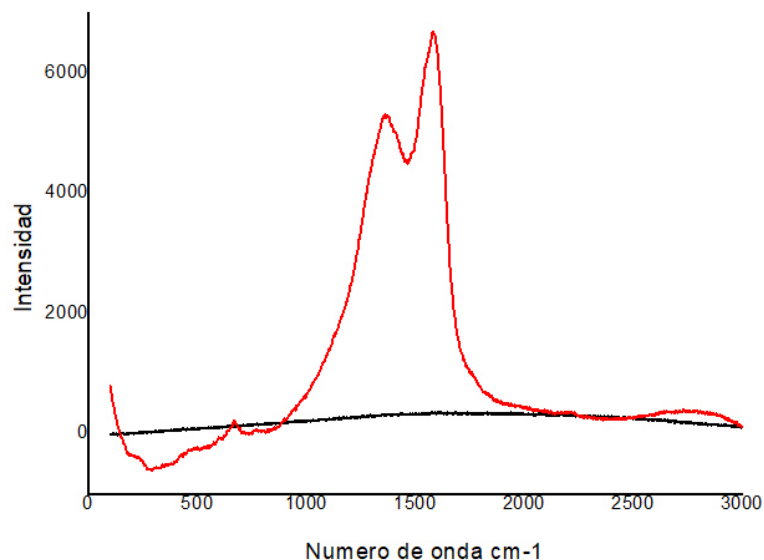


Figura 5. Espectro de Raman de las BNPs

El análisis de las nanopartículas bio-reducidas por TEM confirmó que estaban en forma nanométrica, en su mayoría de forma esférica y tenían un diámetro promedio de 13 nm y una desviación estándar de 6.13 nm. En la figura 6 *a* y *b* se muestran micrografías representativas de TEM. Y la figura 6 *c* es una micrografía representativa del TEM de alta resolución de las nanopartículas bimetálicas esféricas. La figura 6 *d* es una representación de la distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas obtenidas por medio de síntesis verde.

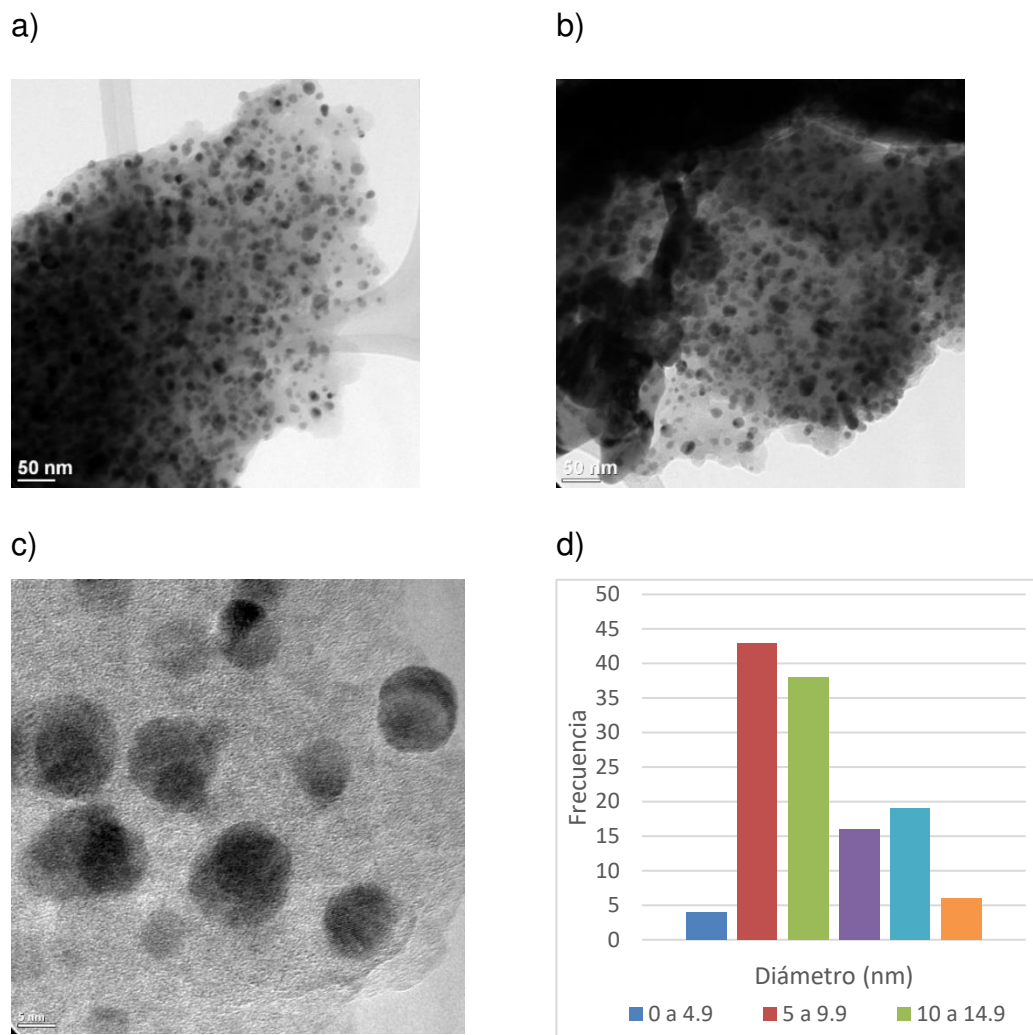
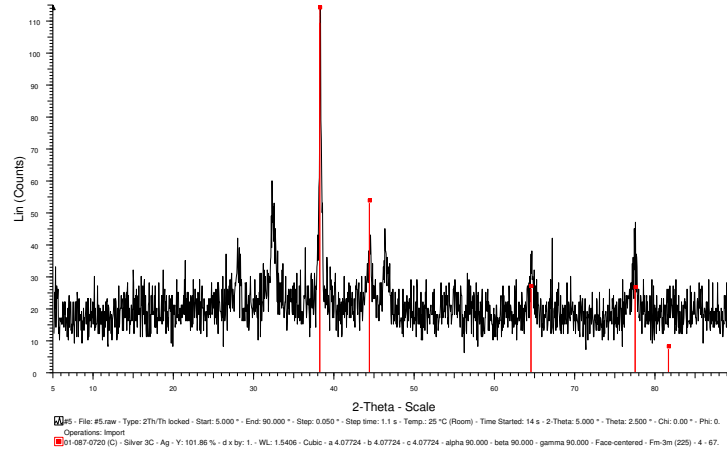


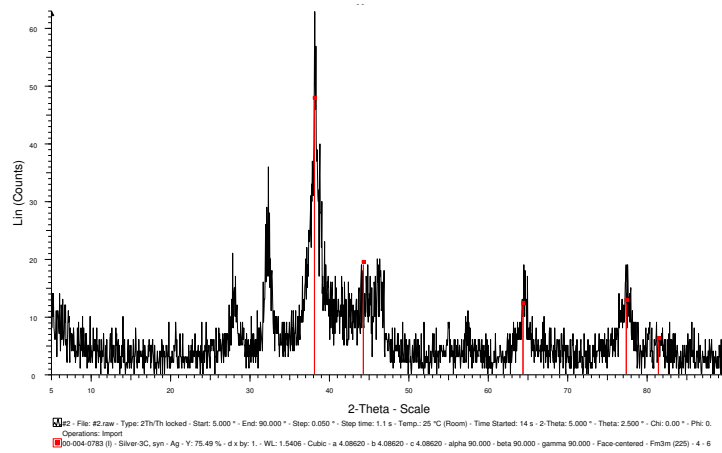
Figura 6. Tamaño de partícula de las nanopartículas bimetálicas. a y b) micrografías del TEM de las BNPs , c) micrografía del TEM de alta resolución y d) gráfico de la distribución de tamaño de partícula de las BNPs

Las NPs monometálicas y bimetálicas se analizaron por XRD y sus difractogramas se muestran en la figura 7, en las cuales se observa en a y b) la presencia de plata elemental, mientras que en c) no fue posible definir la composición. Lo anterior comparado u obtenido con la base de datos del software EVA de la Facultad de Ciencias Químicas, División Estudios de Posgrado.

a)



b)



c)

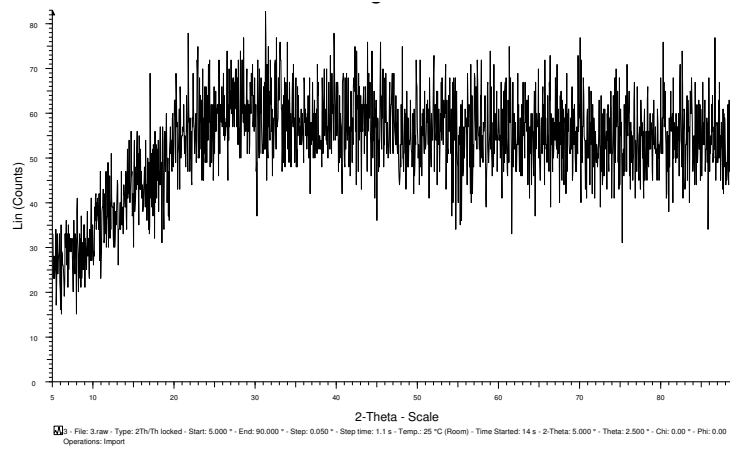


Figura 7. Espectros de XRD de: a) BNPs, b) Ag-NPs y c) Fe-NPs

En la figura 8 se muestra el mapeo en campo oscuro de un área seleccionada de la micrografía para verificar la presencia de los elementos Ag y Fe en la composición de las nanopartículas de estudio. En este se puede observar la presencia de ambos metales en el barrido, así como la presencia de C propia de la materia orgánica del extracto que ha sido notoria en los principales ensayos de caracterización.

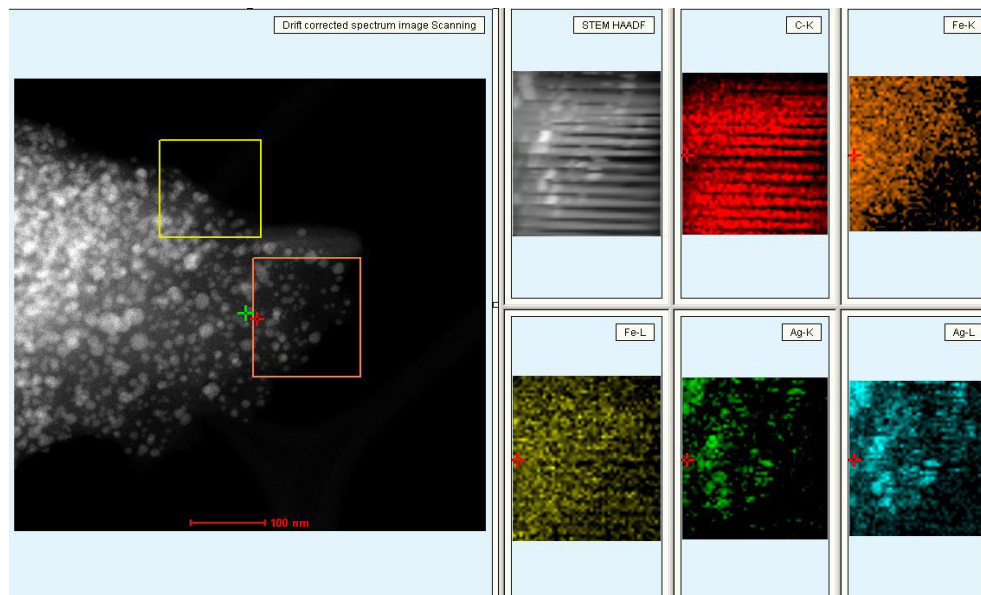


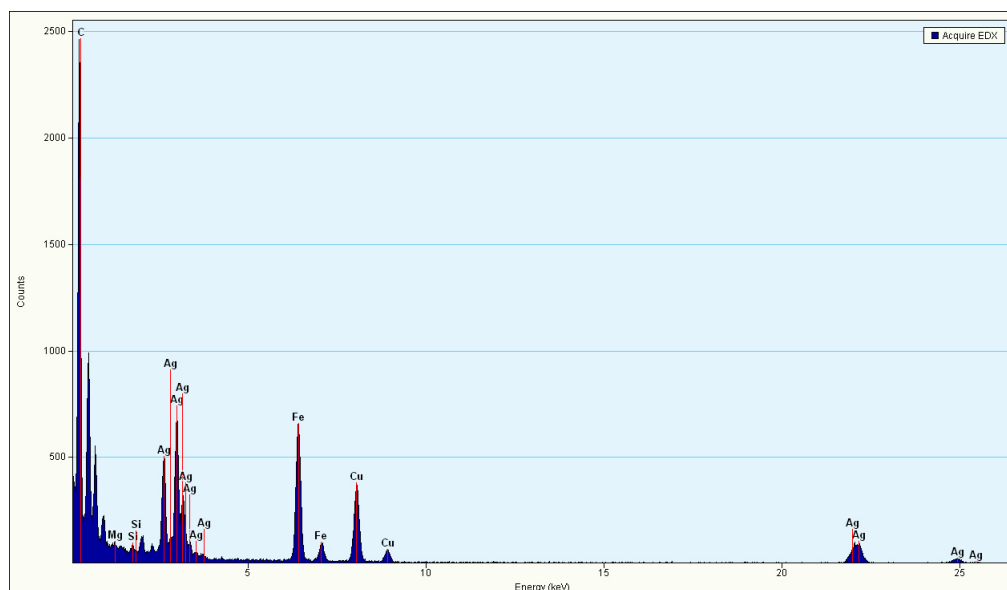
Figura 8. Micrografía del Barrido de campo oscuro anular de ángulo alto de las BNP

En la figura 9 se identificaron los elementos presentes en las nanopartículas bimetálicas de estudio. En el caso del elemento C, este puede atribuirse al material orgánico presente en la muestra por el extracto de la planta utilizado como agente reductor y estabilizante de las nanopartículas.

Además, el C y el Cu son detectados en el espectro de dispersión de energía de rayos X (EDS), debido a que son los elementos que forman la

rejilla (lasey-carbon grid) donde se pone la muestra para analizarla en el TEM.

Por otro lado, el Mg y el Si que aparecen en el espectro EDS puede deberse a arrastre de material durante el manejo de los experimentos o propios de la composición de la planta utilizada, la cual se desconoce su composición.



Quantification Results

Correction method: None

Element	Weight %	Atomic %	Uncert. %	Detector Correction	k-Factor
Fe(K)	41.40	57.71	0.41	0.99	1.357
Ag(K)	58.59	42.28	1.06	0.89	6.435

Figura 9. Espectro de dispersión de Energía de Rayos X de las BNPs

5.3. Resultados prueba rápida de magnetismo

La figura 10 muestra los resultados de la prueba rápida de magnetismo de las nanopartículas bimetálicas. En ella se puede observar del lado izquierdo el imán utilizado para atraer las NPs y del lado derecho ese mismo imán después de pasarlo sobre las BNPs en polvo sintetizadas en este estudio. Se

aprecia claramente la adhesión de las ya mencionadas al imán de referencia.



Figura 10. Del lado izquierdo el imán referencia y del lado derecho el imán ejerciendo un campo magnético atrayendo a él las BNPs

5.4 Incorporación de nanopartículas a esmalte

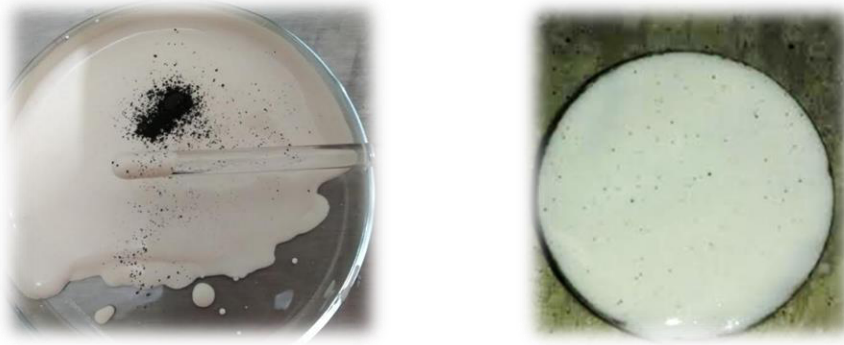


Figura 11. Del lado izquierdo el esmalte comercial con las nanopartículas sin dispersar y del lado derecho la pieza cerámica con BNPs en su esmalte

Al incorporar las nanopartículas al esmalte se puede visualizar en la imagen izquierda de la figura 11 que no se logra una correcta dispersión al poder observar a simple vista los aglomerados (puntos negros) de nanopartículas en la imagen de la pieza cerámica del lado derecho.

5.5. Resultados de pruebas biológicas

5.5.1. Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en medio MH

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, se realizó un cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo MH para para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 12 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 utilizada comienza a partir de las 3.5 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 equivale a una concentración celular de $\sim 10^7$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar MH.

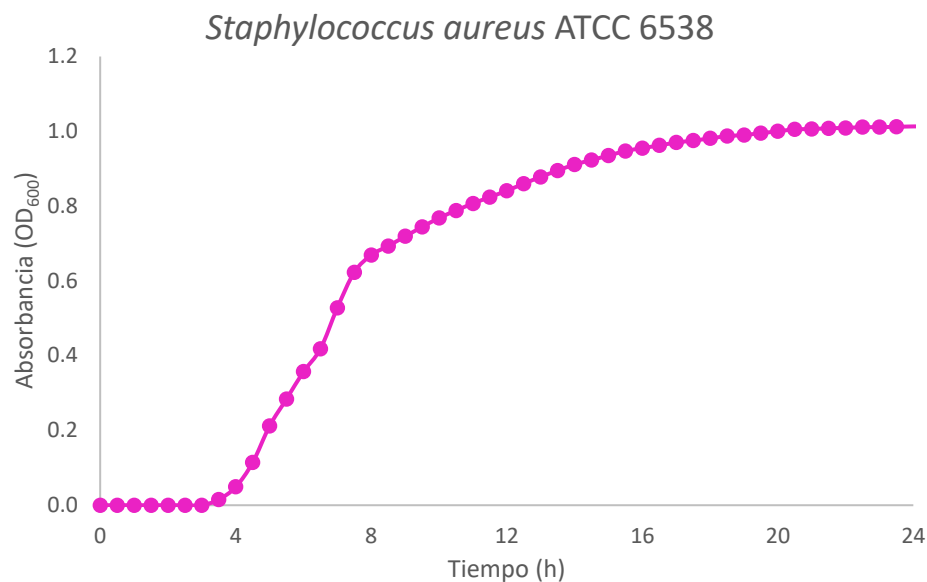


Figura 12. Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

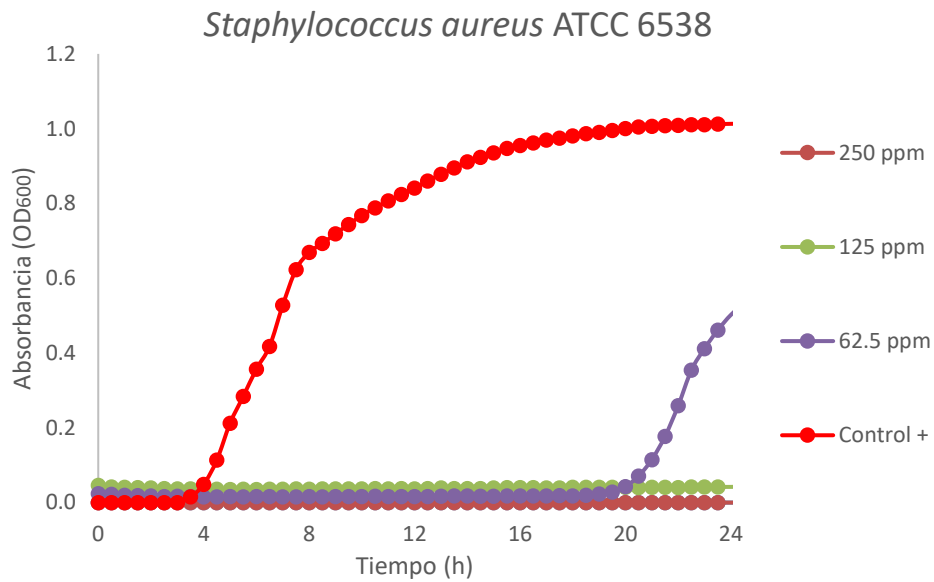
5.5.2 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Una vez identificada la densidad óptica donde comienza la fase de crecimiento exponencial se llevaron a cabo los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	125 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	125 ppm (73.23 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 13 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

a)



b)

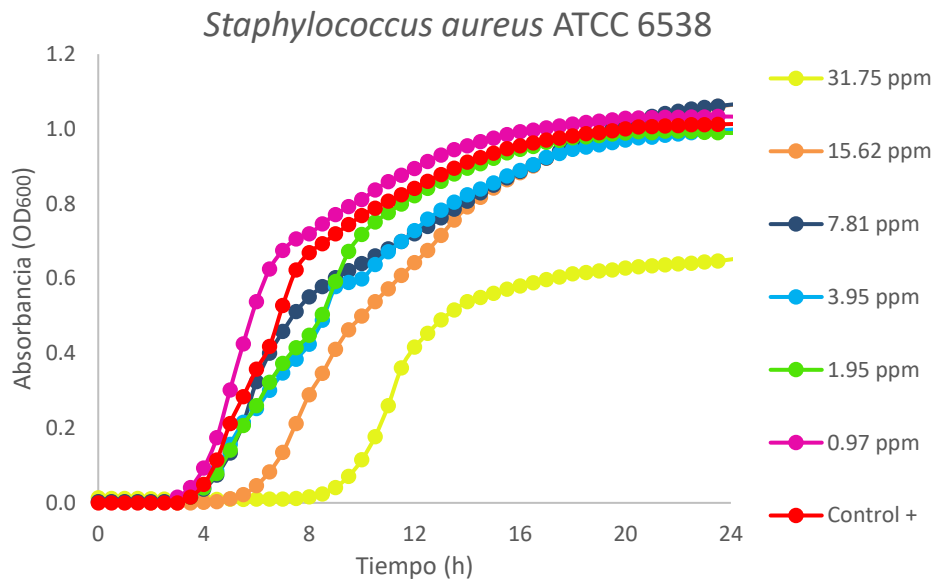
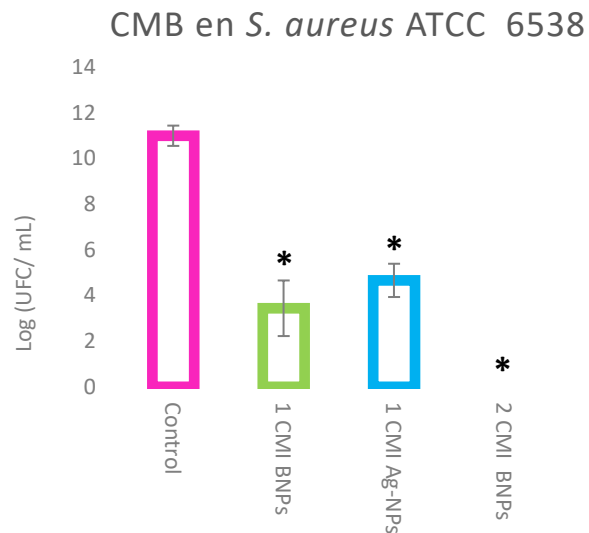


Figura 13. Monitoreo de la determinación de la CMI de BNPs en un cultivo de *S.aureus* ATCC 6538, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo

Se obtuvo un efecto potenciador de los elementos que componen las BNPs al comparar con el efecto que causan ambos metales por separado. Lo anterior haciendo referencia a la tabla 1, donde se observa que las Fe-NPs no presentan propiedades antimicrobianas a las concentraciones evaluadas y que se requieren 125 ppm de Ag-NPs o de BNPs para inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, si revisamos la figura 9, donde se muestra la composición de las BNPs podemos asumir que dichas nanopartículas contienen una menor concentración de plata (73.23 ppm Ag) que la evaluada del elemento en forma de nanopartícula monometálica y que su combinación con hierro es la acción responsable de potencializar la actividad de la plata.

5.5.3 Determinación de las CMBs de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



*: Diferencia significativa entre el control y las CMIs

Figura 14. Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetálicas al cuantificar las células viables de las CMIs en un cultivo de *S. aureus* ATCC 6538

En la figura 14 se visualizan los conteos de la CMI en donde las BNPs y las Ag-NPs tienen una reducción cercana al 70 y 60% de células viables respectivamente durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y corresponde a 250 ppm.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria de las Fe-NPs no se logró determinar, al obtener como resultado su nulo efecto inhibitorio a la concentración más alta evaluada en el proyecto. Por este motivo no se incluyen los resultados correspondientes a la determinación de la CMB de las cepas estudiadas, ya que, al no inhibir el crecimiento del microorganismo, se considera que no puede ser bactericida a las concentraciones evaluadas en este estudio.

5.5.4 Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en medio MH

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, se realizó un cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo MH para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 15 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 utilizada comienza a partir de las 2 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad

óptica de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 equivale a una concentración celular de $\sim 10^7$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar MH.

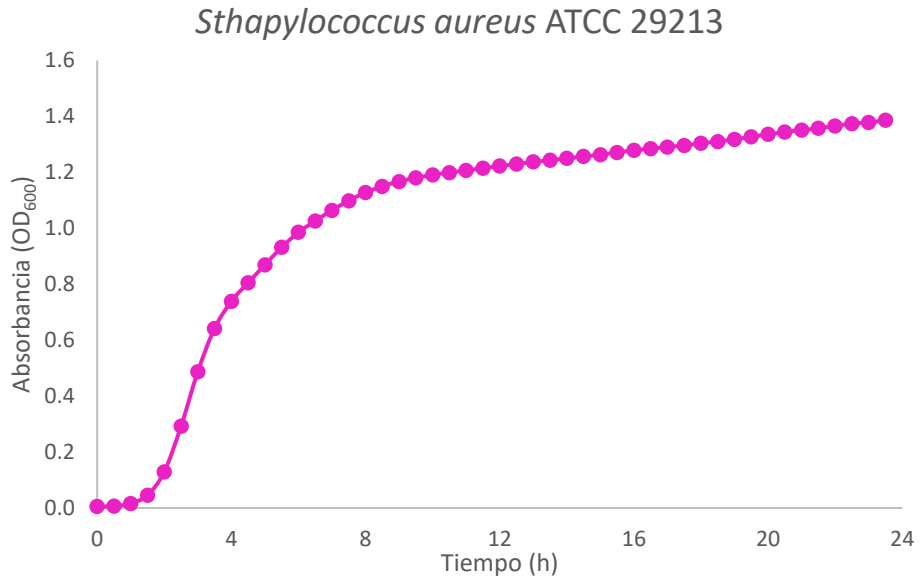


Figura 15. Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

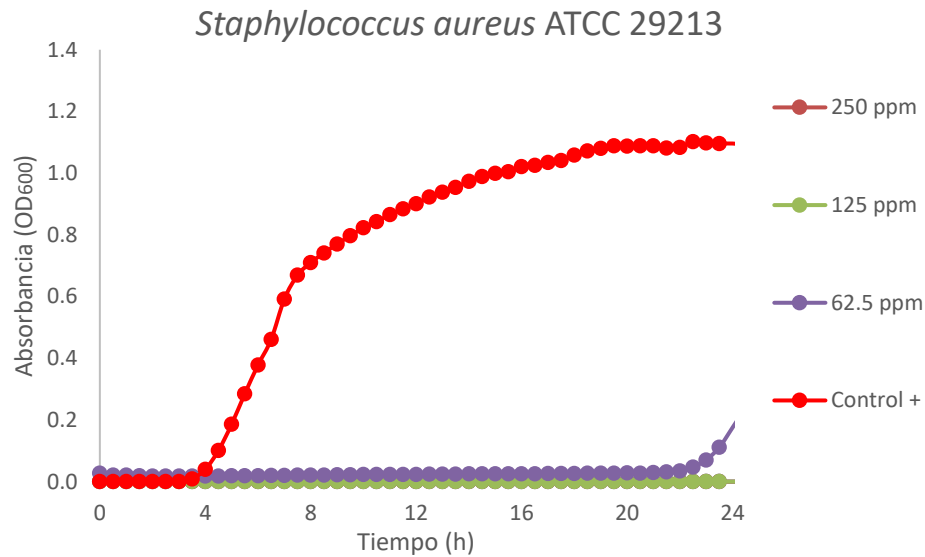
5.5.5 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	125 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	125 ppm (73.23 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 16 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

a)



b)

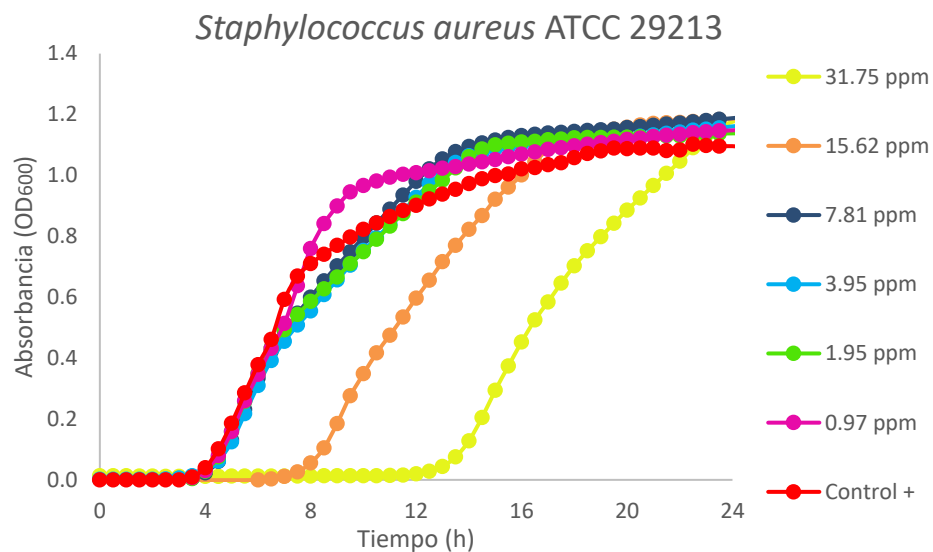
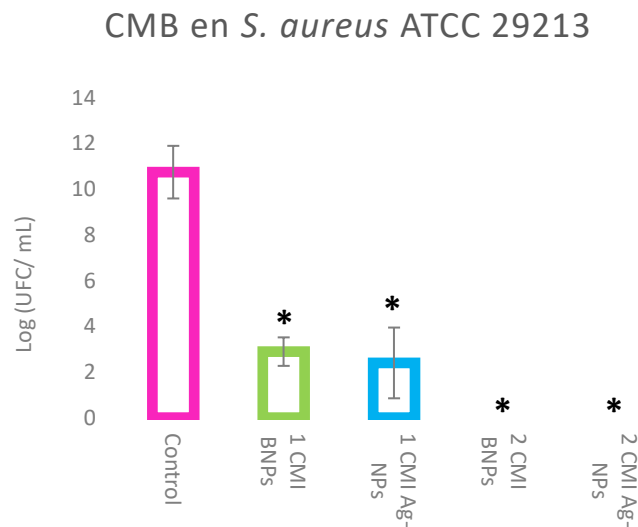


Figura 16. Monitoreo de la determinación de la CMI de BNPs en un cultivo de *S. aureus* ATCC 29213, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo

Se obtuvo un efecto potenciador de los elementos que componen las BNPs al comparar con el efecto que causan ambos metales por separado. Lo

anterior haciendo referencia a la tabla 2, donde se observa que las Fe-NPs no presentan propiedades antimicrobianas a las concentraciones evaluadas y que se requieren 125 ppm de Ag-NPs o de BNPs para inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, si revisamos la figura 9, donde se muestra la composición de las BNPs podemos asumir que dichas nanopartículas contienen una menor concentración de plata (73.23 ppm Ag) que la evaluada del elemento en forma de nanopartícula monometálica y que su combinación con hierro es la acción responsable de la sinergia mostrada en los resultados.

5.5.6 Determinación de las CMBs de las nanopartículas metálicas y bimetalicas en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213



*: Diferencia significativa entre el control y las CMIs

Figura 17. Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetalicas al cuantificar las células viables de las CMIs en un cultivo de *S. aureus* ATCC 29213

En la figura 17 se visualizan los conteos de la CMI en donde las BNPs y

las Ag-NPs tienen una reducción cercana al 75% de células viables en ambos casos durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y corresponde a 250 ppm.

5.5.7 Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente en medio MH

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente se realizó un cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo MH para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 18 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente utilizada comienza a partir de las 4.5 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *Staphylococcus aureus resistente* equivale a una concentración celular de $\sim 10^7$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar MH.

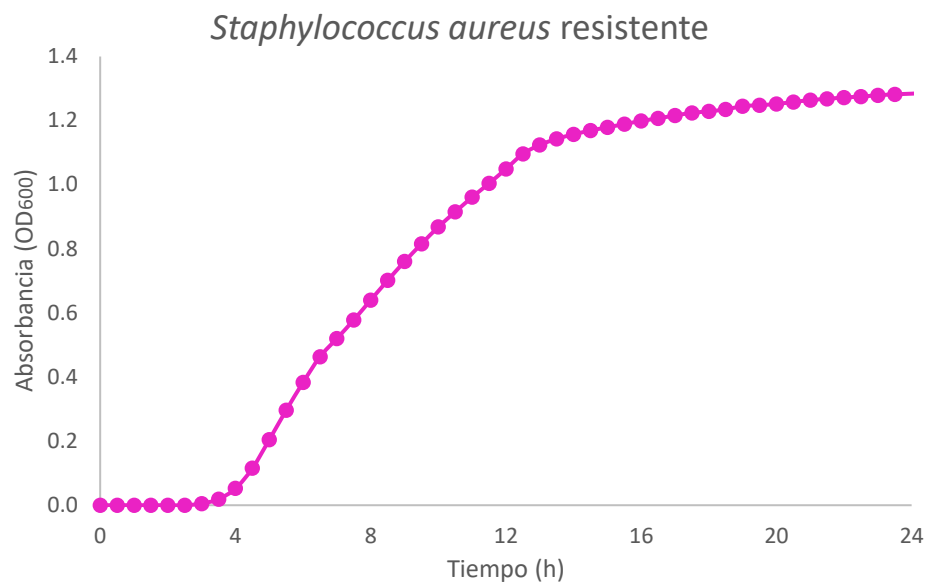


Figura 18. Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente

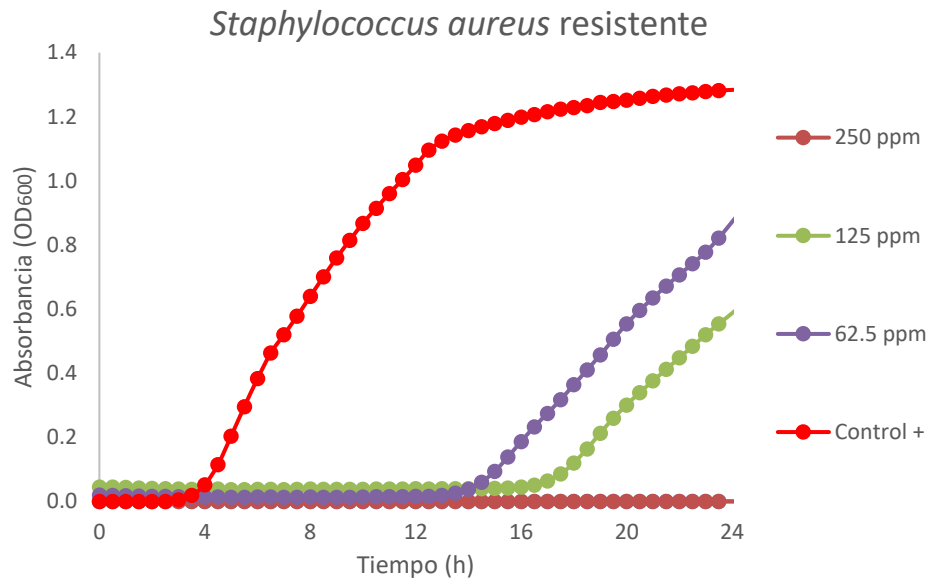
5.5.8 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Staphylococcus aureus* resistente

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	125 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	250 ppm (146.47 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 19 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

a)



b)

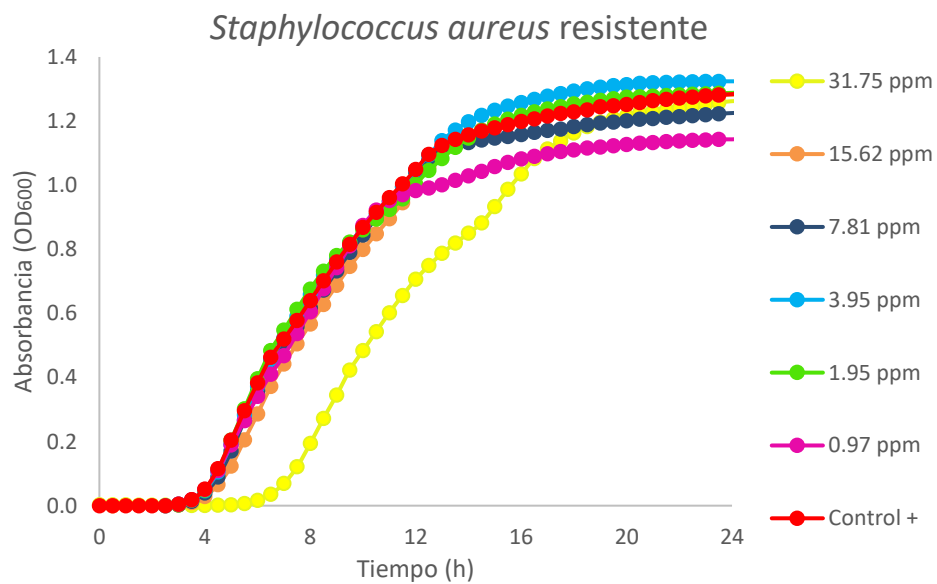
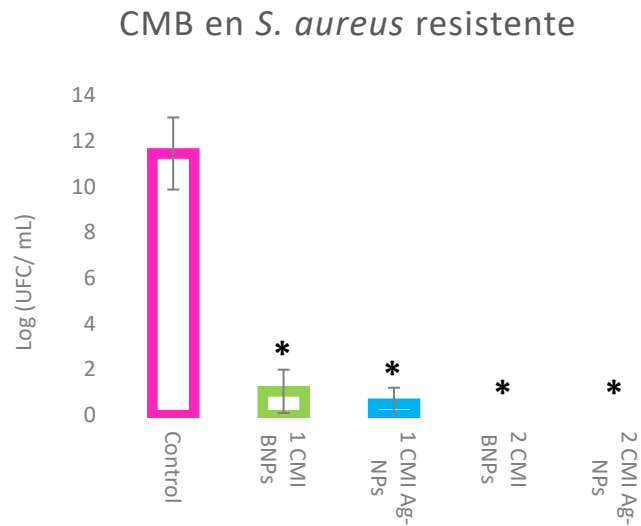


Figura 19. Monitoreo de la determinación de la CMI de BNP en un cultivo de *S. aureus* resistente, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo

En este caso, se requiere el doble de concentración de BNP que de Ag-NPs para inhibir el crecimiento del microorganismo. Al revisar la figura 9

de la composición de las BNPs se puede inferir que la concentración de plata es mayor al uso de las Ag-NPs monometálicas. El efecto en este microorganismo es indiferente.

5.5.9 Determinación de las CMBs de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Staphylococcus aureus* resistente



*: Diferencia significativa entre el control y las CMI

Figura 20. Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetálicas al cuantificar las células viables de las CMI en *Staphylococcus aureus* resistente

En la figura 20 se visualizan los conteos de la CMI en donde las BNPs y las Ag-NPs tienen una reducción superior al 90% de células viables en ambos casos durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y corresponde a 250 ppm de las Ag-NPs y 500 ppm de las BNPs.

5.5.10 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 11229 en medio MH

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229 se realizó un cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo MH para para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 21 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229 utilizada comienza a partir de las 2.5 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *Escherichia coli* ATCC 11229 equivale a una concentración celular de $\sim 10^7$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar MH.

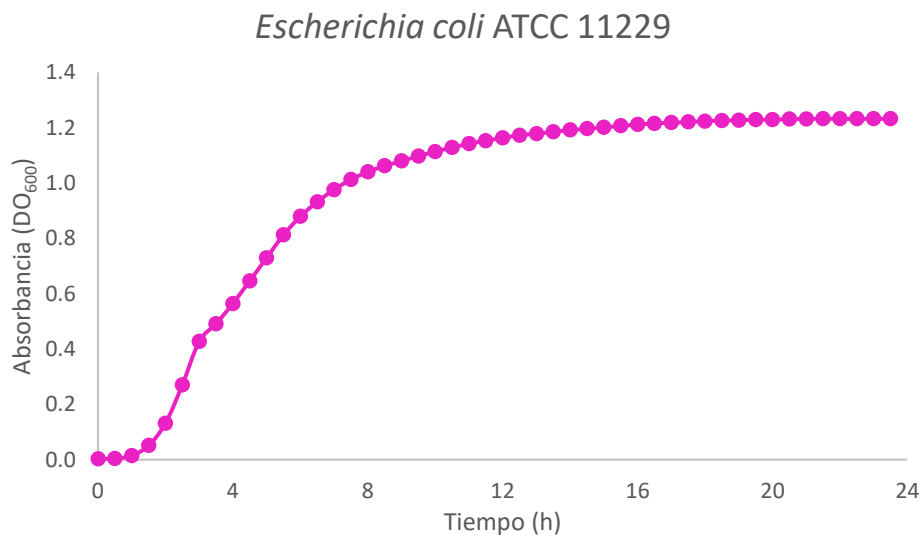


Figura 21. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 11229

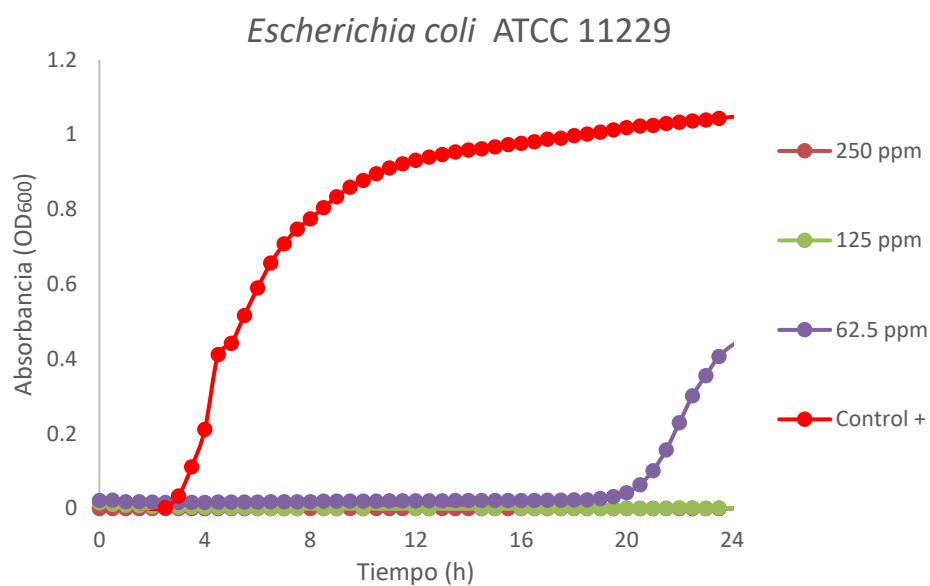
5.5.11 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Escherichia coli* ATCC 11229

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	125 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	125 ppm (73.23 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 22 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

a)



b)

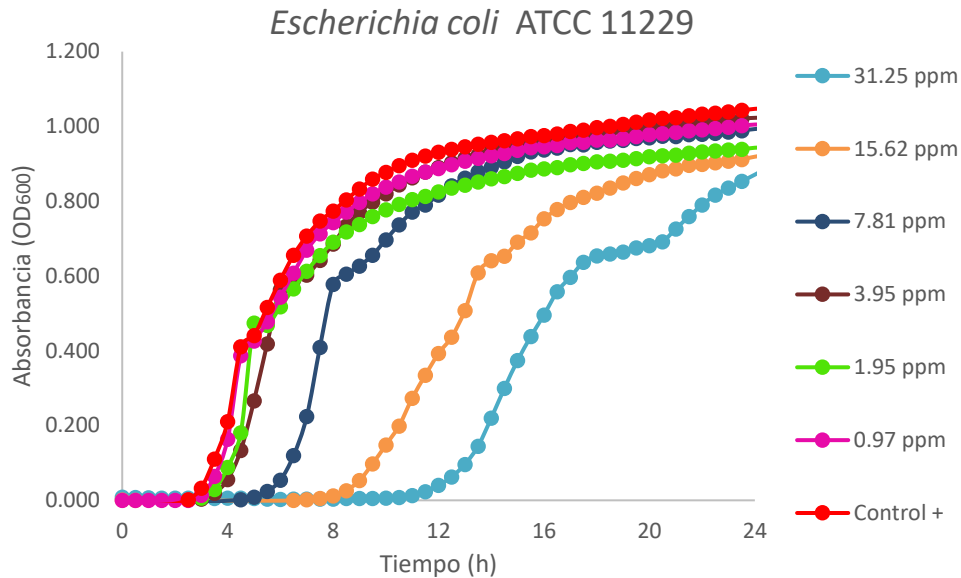
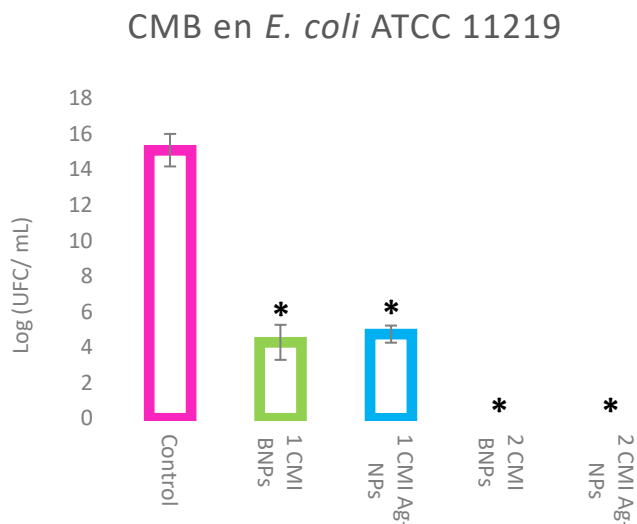


Figura 22. Monitoreo de la determinación de la CMI de BNPs en un cultivo de *E. coli* ATCC 11229, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo

En este caso, se obtuvo un efecto potenciador de los elementos que componen las BNPs al comparar con el efecto que causan ambos metales por separado. Lo anterior haciendo referencia a la tabla 4, donde se observa que las Fe- NPs no presentan propiedades antimicrobianas a las concentraciones evaluadas y que se requieren 125 ppm de Ag-NPs o de BNPs para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Sin embargo, si revisamos la figura 9 donde se muestra la composición de las BNPs, podemos asumir que dichas nanopartículas contienen una menor concentración de plata (73.23 ppm Ag) que la evaluada del elemento en forma de nanopartícula monometálica y que su combinación con hierro es la acción responsable de la sinergia mostrada en los resultados.

5.5.12 Determinación de las CMBs de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Escherichia coli* ATCC 11229



*: Diferencia significativa entre el control y las CMI

Figura 23 Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetálicas al cuantificar las células viables de las CMI en *E. coli* ATCC 11219

En la figura 23 se visualizan los conteos de la CMI en donde las BNPs y las Ag-NPs tienen una reducción cerca del 70% de células viables en ambos casos durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y corresponde a 250 ppm para ambas nanopartículas.

5.5.13 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 8739 en medio MH

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 se realizó un cultivo bajo las condiciones

mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo MH para para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 24 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 utilizada comienza a partir de las 2.5 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *Escherichia coli* ATCC 8739 equivale a una concentración celular de $\sim 10^7$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar MH.

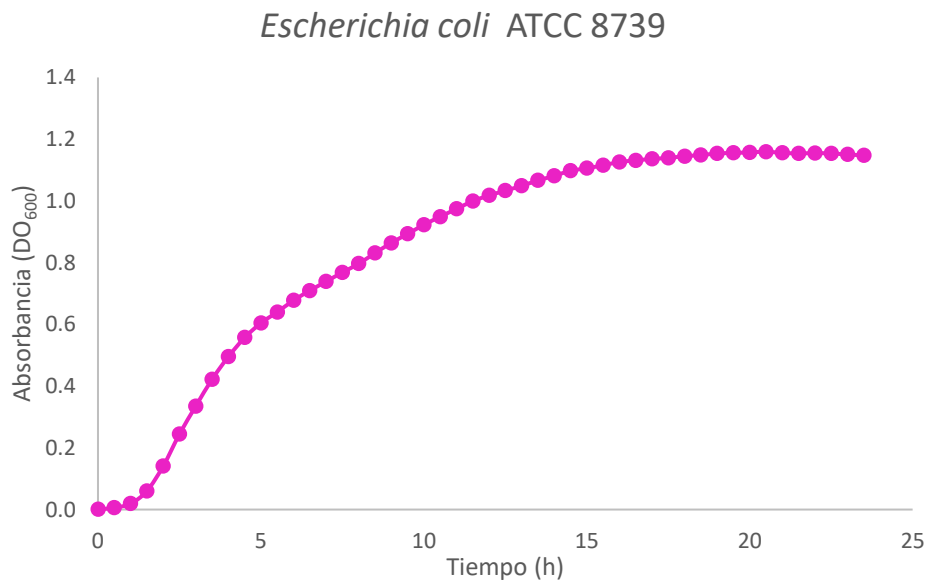


Figura 24. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 8739

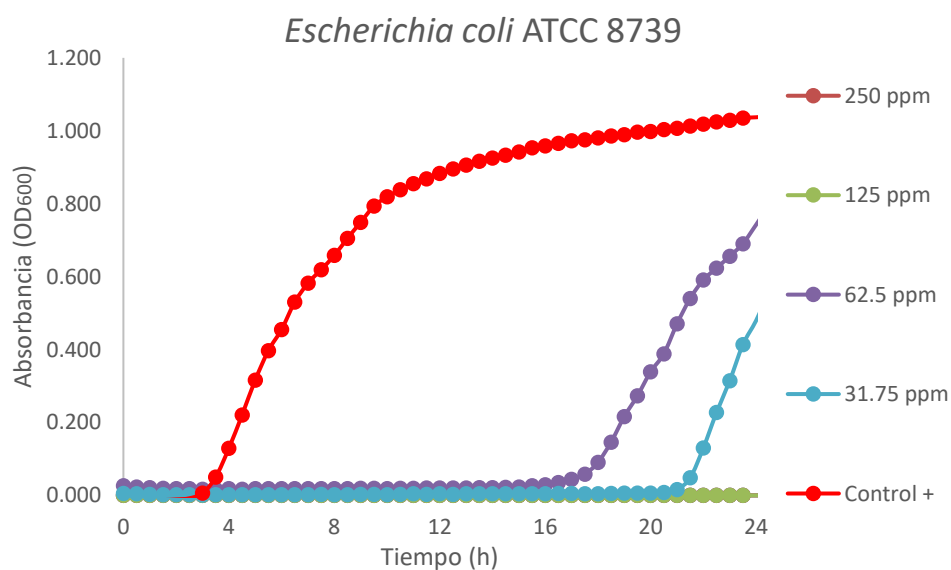
5.5.14 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Escherichia coli* ATCC 8739

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	62.5 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	125 ppm (73.23 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 25 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

a)



b)

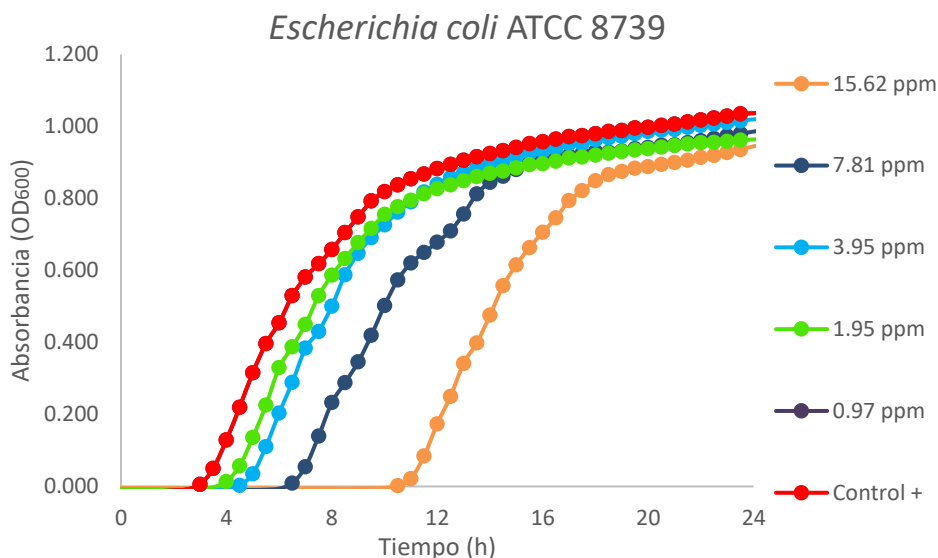


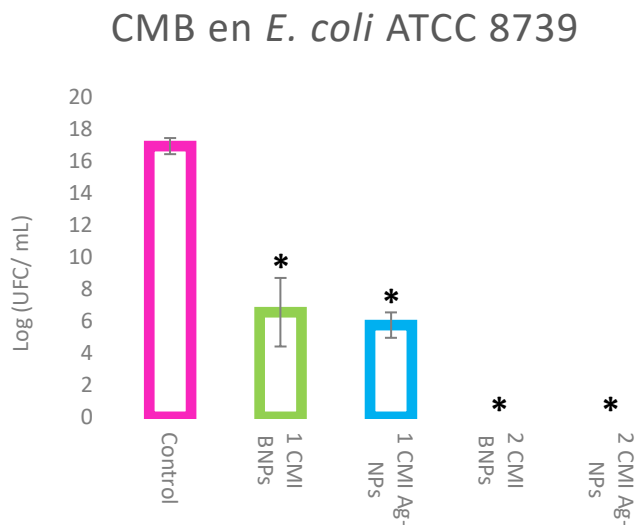
Figura 25. Monitoreo de la determinación de la CMI de BNP en un cultivo de *E. coli* ATCC 8739, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo

En este caso, se requiere el doble de concentración de BNP que de Ag-NPs para inhibir el crecimiento del microorganismo. Al revisar la figura 9 de la composición de las BNP se puede inferir que la concentración de plata es mayor al uso de las Ag-NPs monometálicas. El efecto en este microorganismo es indiferente.

5.5.15 Determinación de las CMBs de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Escherichia coli* ATCC 8739

En la figura 26 se visualizan los conteos de la CMI en donde las BNP y las Ag-NPs tienen una reducción superior al 60% de células viables en ambos casos durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y

corresponde a 125 ppm para las Ag-NPs y 250 ppm para las BNPs.



*: Diferencia significativa entre el control y las CMI

Figura 26. Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetálicas al cuantificar las células viables de las CMI en *E. coli* ATCC 8739

5.5.16 Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en medio MH

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se realizó un cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo MH para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 27 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada comienza a partir de las 3 h, al alcanzar una densidad óptica aproximada de

0.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *P. aeruginosa* ATCC 27853 equivale a $\sim 10^7$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar MH.

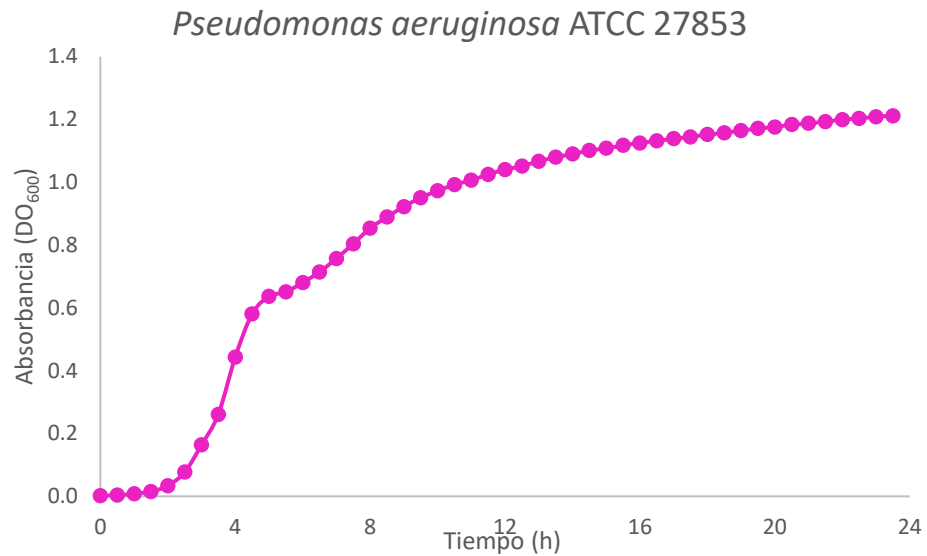


Figura 27. Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853

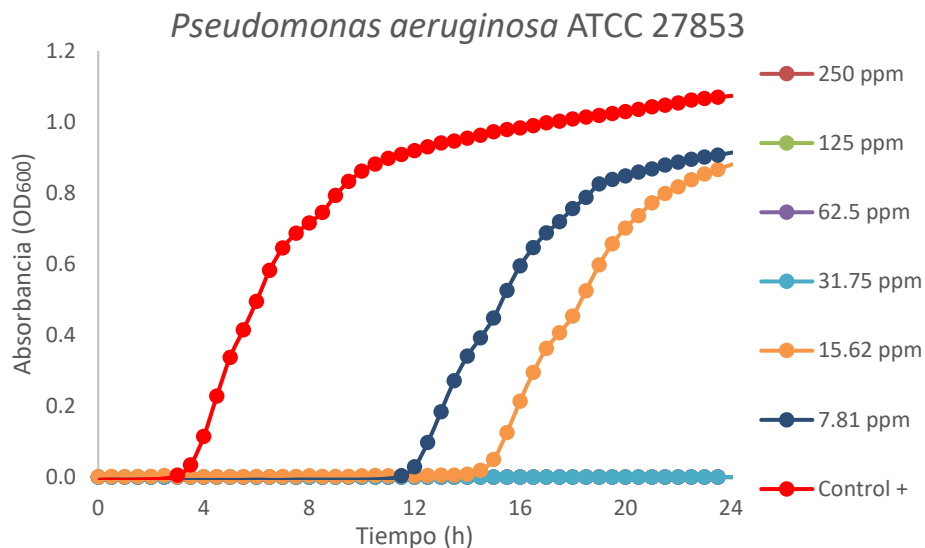
5.5.17 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	62.5 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	31.25 ppm (18.3 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 28 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

a)



b)

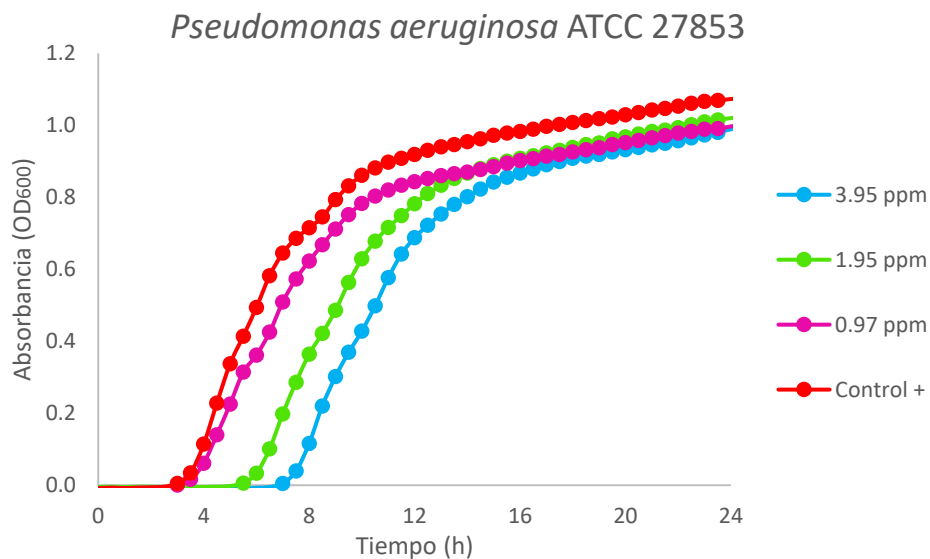
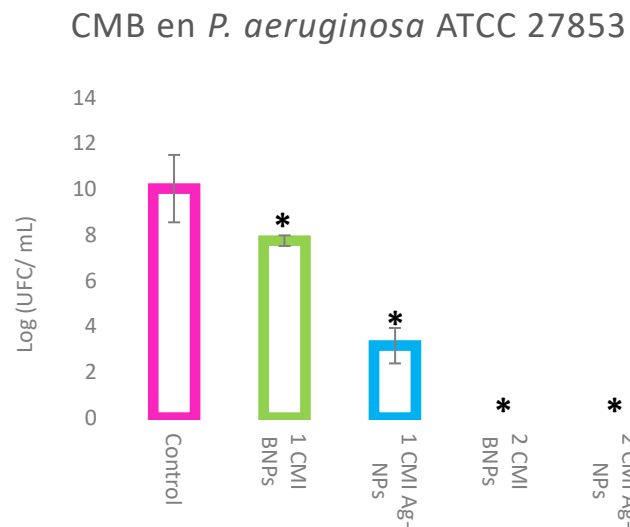


Figura 28. Monitoreo de la CMI de BNPs en un cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 27853, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo

Se visualiza una notable sinergia de los elementos que componen las BNPs al comparar con el efecto que causan ambos metales por separado. Lo

anterior haciendo referencia a la tabla 6, en donde se puede observar que las Fe-NPs no presentan propiedades antimicrobianas a las concentraciones evaluadas y que se requieren 62.5 ppm de Ag-NPs o 31.25 ppm de BNPs para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Sin embargo, si revisamos la figura 9 en donde se muestra la composición de las BNPs, podemos asumir que dichas nanopartículas únicamente contienen cerca de 20 ppm de plata y que su combinación con hierro es la acción responsable de la sinergia mostrada en los resultados.

5.5.18 Determinación de las CMB de las nanopartículas metálicas y bimetalicas en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



*: Diferencia significativa entre el control y las CMI

Figura 29. Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetalicas al cuantificar las células viables de las CMI en *P. aeruginosa* ATCC 27853

En la figura 29 se visualizan los conteos de la CMI en donde las BNPs y

las Ag-NPs tienen una reducción cercana al 29 y 65% de células viables respectivamente durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y corresponde a 125 ppm de Ag-NPs y 62.5 ppm de BNPs.

5.5.19 Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* resistente en medio MH

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente se realizó un cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo MH para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 30 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente utilizada comienza a partir de las 4.5 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *Pseudomonas aeruginosa* resistente equivale a una concentración celular de $\sim 10^7$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar MH.

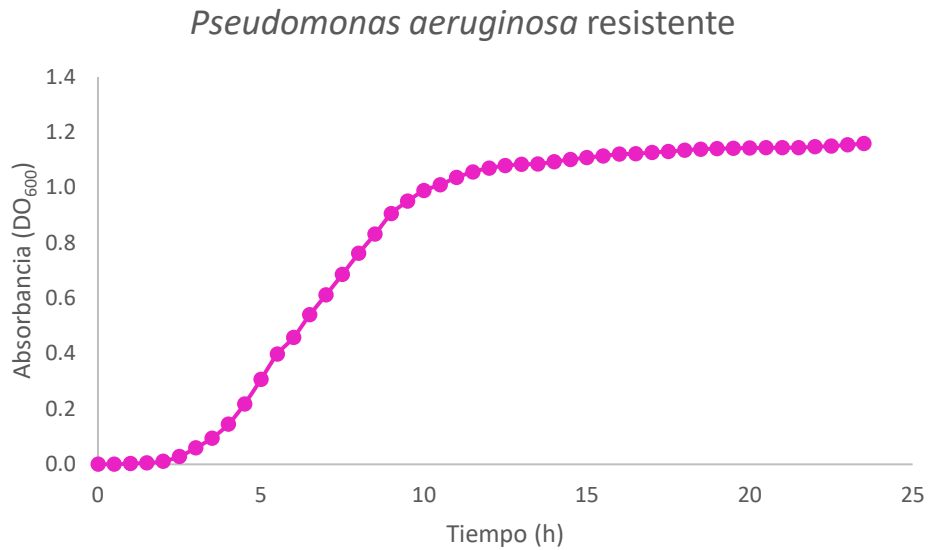


Figura 30. Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* resistente

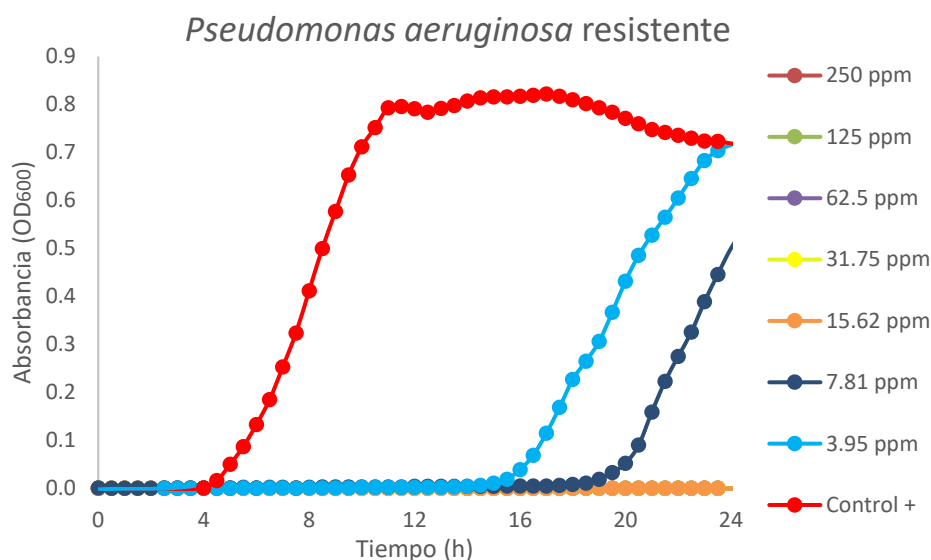
5.5.20 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	31.25 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	15.62 ppm (9.15 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 31 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

a)



b)

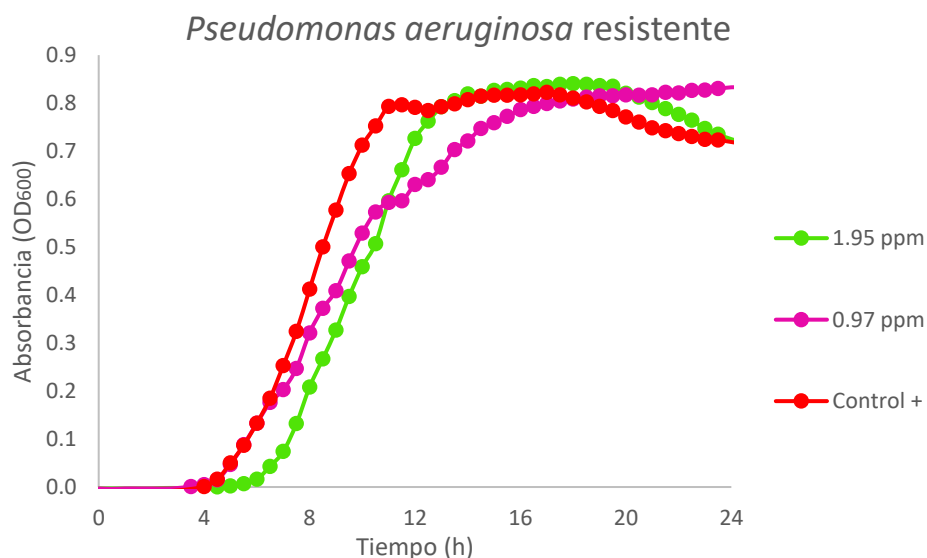
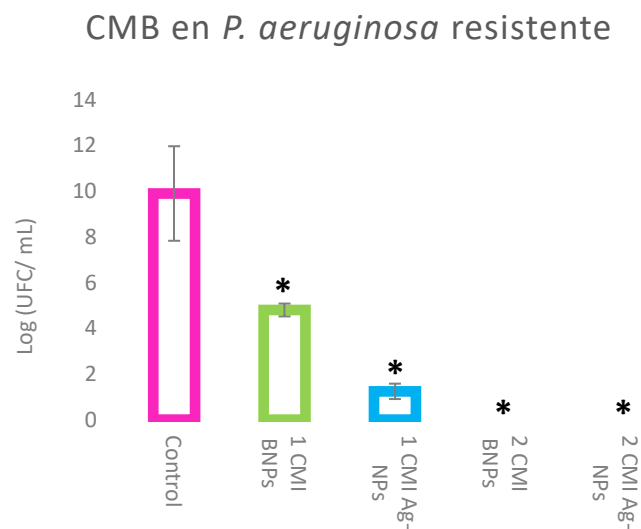


Figura 31. Monitoreo de la determinación de la CMI de BNP en un cultivo de *P. aeruginosa* resistente, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo

Es notable la sinergia de los elementos que componen las BNP al comparar con el efecto que causan ambos metales por separado. Lo anterior haciendo referencia a la tabla 7, donde se puede observar que las Fe-NPs no

presentan propiedades antimicrobianas a las concentraciones evaluadas y que se requieren 31.25 ppm de Ag-NPs o 15.62 ppm de BNPs para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* resistente. Sin embargo, si revisamos la figura 9 en donde se muestra la composición de las BNPs, podemos asumir que dichas nanopartículas únicamente contienen cerca de 10 ppm de plata y que su combinación con hierro es la acción responsable de la sinergia mostrada en los resultados.

5.5.21 Determinación de concentraciones mínimas bactericidas de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente



*: Diferencia significativa entre el control y las CMI

Figura 32. Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetálicas al cuantificar las células viables de las CMI en *P. aeruginosa* resistente

En la figura 32 se pueden visualizar los conteos de la CMI en donde las

BNPs y las Ag-NPs tienen una reducción cercana al 50 y 85% de células viables respectivamente durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y corresponde a de 62.5 ppm de Ag-NPs y 31.25 ppm de BNPs.

5.5.22 Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 en medio MH.

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 ATCC 27853 se realizó un cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo MH para para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 33 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 utilizada comienza a partir de las 16 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.1 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 equivale a una concentración celular de $\sim 10^5$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar MH.

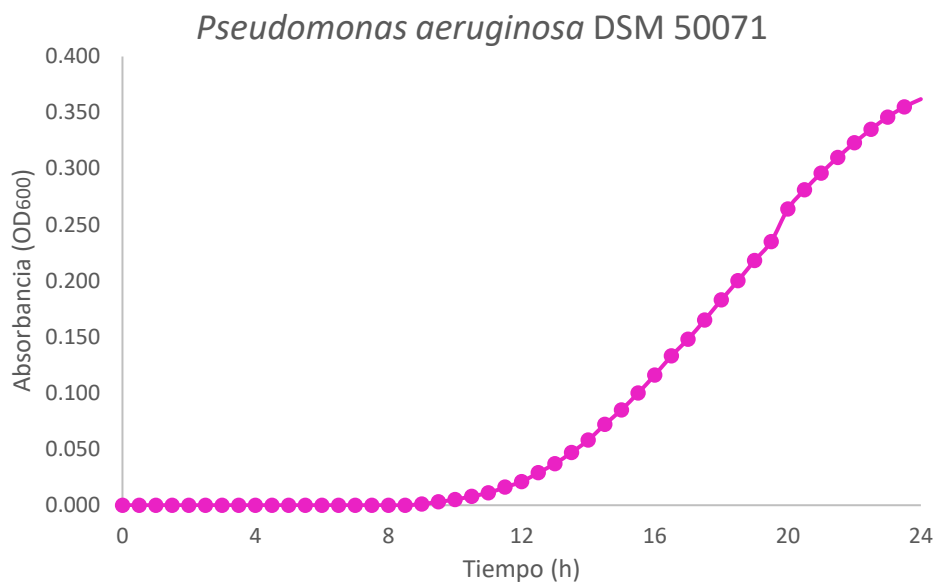


Figura 33. Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071

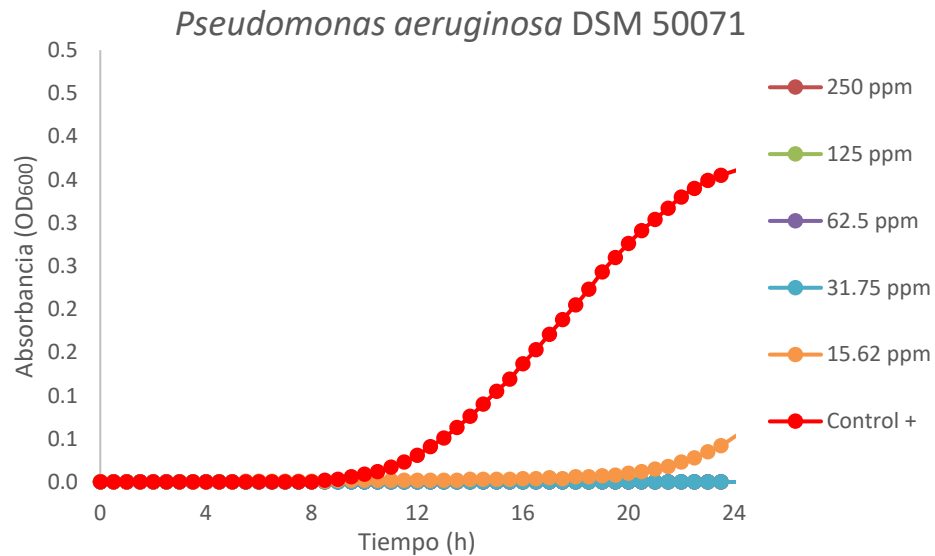
5.5.23 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	15.62 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	31.75 ppm (18.3 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 34 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias

a)



b)

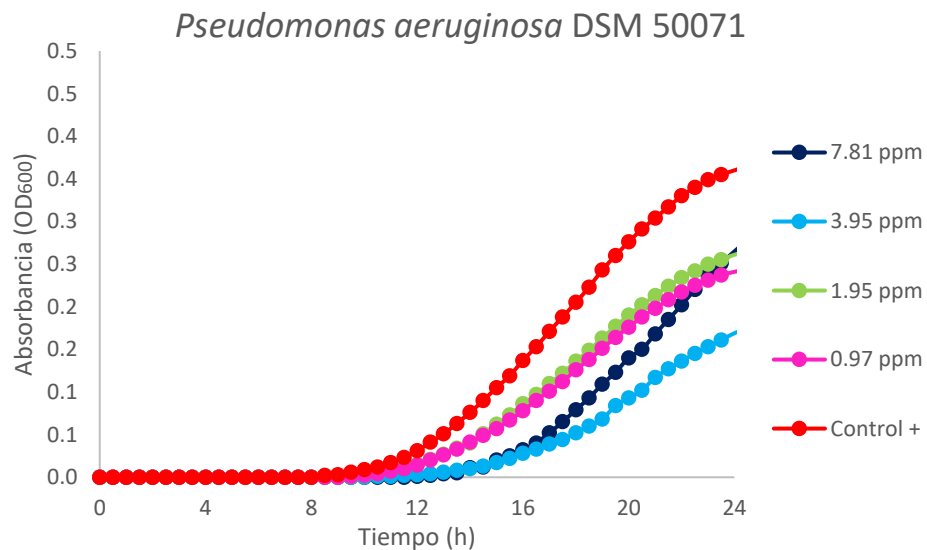
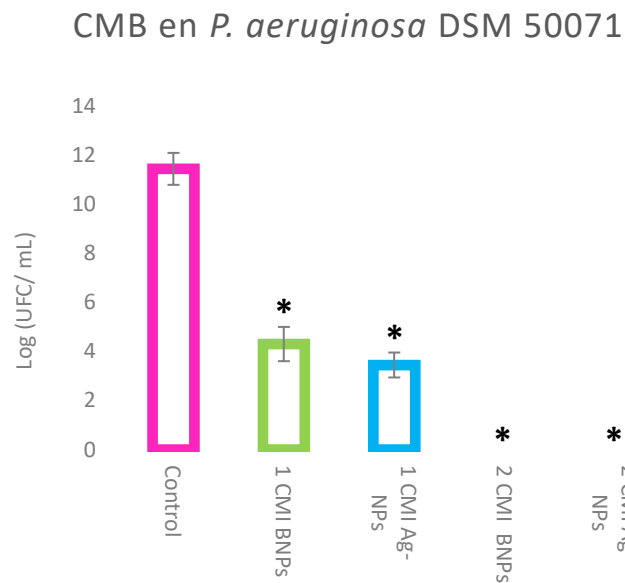


Figura 34. Monitoreo de la determinación de la CMI de BNP en un cultivo de *P. aeruginosa* DSM 50071, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo.

En este caso, se requiere el doble de concentración de BNP que de Ag-NPs para inhibir el crecimiento del microorganismo. Al revisar la figura 9 de la composición de las BNP se puede inferir que la concentración de plata

es mayor a lo que se requiere utilizando únicamente las Ag-NPs, por lo tanto, se reporta un efecto indiferente.

5.5.24 Determinación de las CMBs de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071



*: Diferencia significativa entre el control y las CMI

Figura 35. Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetálicas al cuantificar las células viables de las CMI en *P. aeruginosa* DSM 50071

En la figura 35 se visualizan los conteos de la CMI en donde las BNPs y las Ag-NPs tienen una reducción superior al 60% de células viables en ambos casos durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y corresponde a 31.25 ppm para las Ag-NPs y 62.5 ppm para las BNPs.

5.5.25 Curva de crecimiento de *Candida albicans* en medio YM

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *Candida albicans* se realizó un cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.6 en el cual se monitoreó su absorbancia a 600nm, y una vez identificada esta fase se hizo una réplica en un tubo estéril con caldo YM para para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada realizando dilución y cuenta en placa.

En la figura 36 se muestra que la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *Candida albicans* utilizada comienza a partir de las 11 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.3 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *Candida albicans* equivale a una concentración celular de $\sim 10^5$ células/mL, corroborada por un conteo de células viables en placas de agar YM.

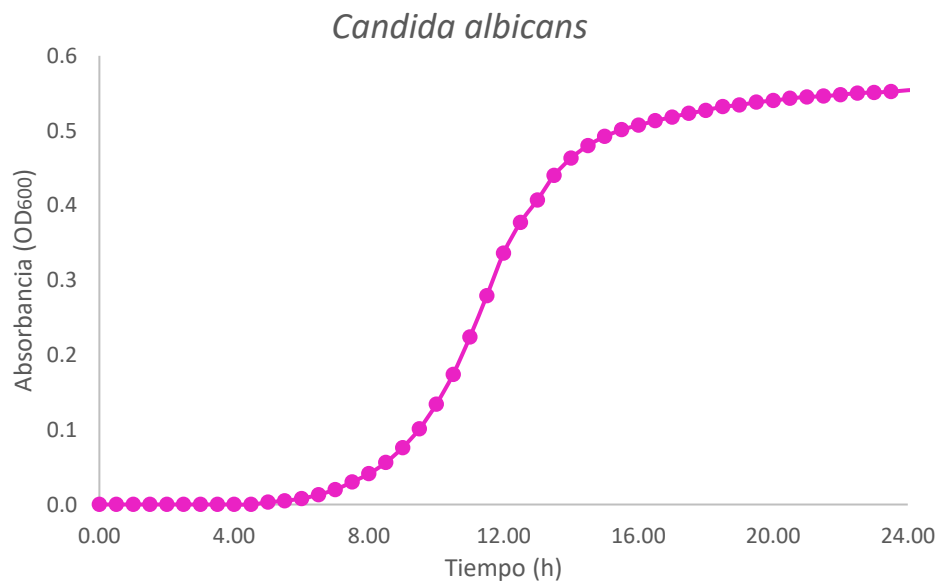


Figura 36. Crecimiento de *Candida albicans*

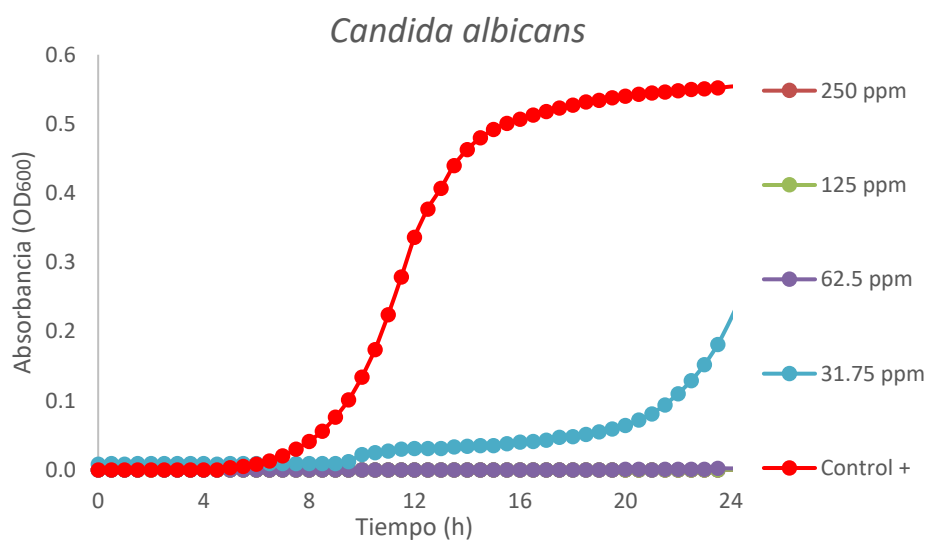
5.5.26 Determinación de las CMI de las nanopartículas metálicas y bimetálicas en *Candida albicans*

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones mínimas inhibitorias de las NPs en un cultivo de <i>Candida albicans</i>	
Nanopartícula	CMI (ppm)
Ag	125 ppm
Fe	>250 ppm
Bimetálicas	62.5 ppm (36.61 ppm Ag)

Más a detalle se muestra en la figura 37 el monitoreo de la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

a)



b)

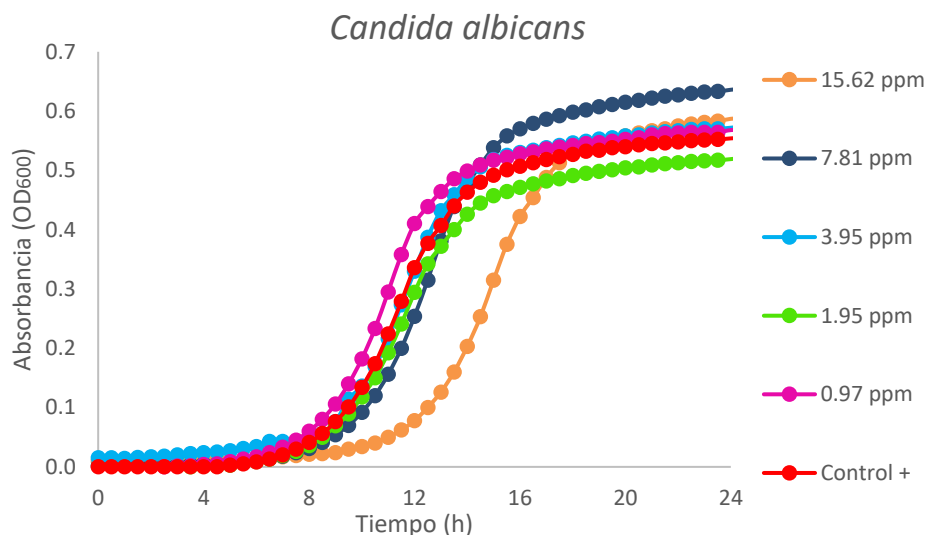
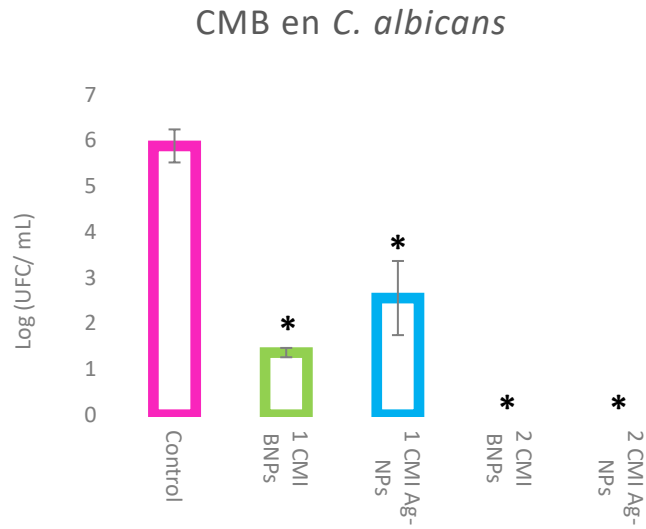


Figura 37. Monitoreo de la determinación de la CMI de BNP en un cultivo de *C. albicans*, donde a) muestra las concentraciones cercanas a la CMI y b) muestra bajas concentraciones cercanas al comportamiento del control positivo

Se visualiza la sinergia de los elementos que componen las BNP al comparar con el efecto que causan ambos metales por separado. Lo anterior haciendo referencia a la tabla 9, en donde se puede observar que las Fe-NPs no presentan propiedades antimicrobianas a las concentraciones evaluadas y que se requieren 125 ppm de Ag-NPs o 62.5 ppm de BNP para inhibir el crecimiento de *C. albicans*. Sin embargo, si revisamos la figura 9, podemos observar la composición de las BNP y asumir que dichas nanopartículas únicamente contienen cerca de 40 ppm de plata y que su combinación con hierro es la acción responsable de la sinergia mostrada en los resultados.

5.5.27 Determinación de las CMBs de las nanopartículas metálicas y

bimetálicas en *Candida albicans*



*: Diferencia significativa entre el control y las CMI

Figura 38. Determinación de la CMB de nanopartículas de Ag y bimetálicas al cuantificar las células viables de las CMI en *C. albicans*

En la figura 38 se visualizan los conteos de la CMI donde las BNPs y las Ag-NPs tienen una reducción cercana al 80 y 60% de células viables respectivamente durante los ensayos de determinación de la CMB. La concentración que no presentó células viables fue de 2 veces la CMI y corresponde a 31.25 ppm para las Ag-NPs y 62.5 ppm para las BNPs.

5.6 Determinación de la actividad antibacteriana de superficies cerámicas con nanopartículas bimetálicas contra un cultivo de *E.coli* ATCC 8739

Los resultados se calculan utilizando la siguiente fórmula:

- *Porcentaje de inhibición:*

$$\% \text{ inhibición} = \frac{N(\text{estándar}) - N(\text{antibacterial})}{N(\text{estándar})} \times 100$$

Donde:

Estándar = promedio de células a las 24 horas de la inoculación de las piezas no tratadas

Antibacterial= promedio de células a las 24 horas de la inoculación de las piezas con antibacterial

En la tabla 10 se presenta el porcentaje de inhibición de crecimiento en las muestras evaluadas.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano				
MUESTRA	BACTERIA	N (STD) UFC/ml	N (MUESTRA) UFC/ml	INHIBICIÓN
BNPs	<i>E. coli</i>	4.73×10^8	2.00×10^8	57.7 %

Las muestras estudiadas que contienen las nanopartículas bimetálicas poseen propiedades antibacteriales al inhibir considerablemente el crecimiento bacteriano, con un porcentaje de 57.7% de inhibición comparado con la muestra estándar que preparada en las mismas condiciones.

CAPITULO 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La utilización de materiales de plantas medicinales, microorganismos, enzimas para la síntesis de nanopartículas se ha revolucionado en los últimos años.⁷⁹.

Se ha estudiado una amplia gama de plantas para la síntesis de nanopartículas y de acuerdo con el uso de cada una de estas plantas se reportan diversos tamaños de partículas por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión. La variación puede deberse a la naturaleza de los componentes, así como a las condiciones de la síntesis.

En la síntesis de Ag-NPs, la reducción de este elemento es confirmada al adquirir una coloración café intensa característica de estas nanopartículas.⁸⁰⁻⁸².

En el caso del hierro, la reducción de los iones Fe^{+3} es confirmada por el cambio de color visible en la mezcla de reacción ⁸³. En las síntesis de nanopartículas de hierro y bimetálicas se obtuvo un cambio de color a negro, el cual coincide con lo reportado por Devatha *et al.* donde describe que el

cambio de color indica la formación de nanopartículas de hierro ⁶⁸. Lo anterior nos confirma que en ambas reacciones logramos reducir el hierro. El progreso de la reacción de síntesis de nanopartículas se observa utilizando un espectrofotómetro UV-Visible.

En un estudio, Pattanayak y Nayak ⁸⁴ utilizaron el extracto de hojas de *Azadirachta indica* (neem) bajo condiciones atmosféricas para obtener nanopartículas de hierro. La Espectroscopía UV-Vis de partículas de hierro se encuentra en el rango de 216-265 nm.

Otros autores reportan que los picos de absorción para nanopartículas de hierro utilizando *Magnolia champaca* son de 259 nm y 282 nm ⁸⁵.

En el caso de las nanopartículas de plata, se ha reportado los espectros UV-Vis en el intervalo de 400 nm a 425 nm. La banda de absorción en la región de luz visible (350 nm - 550 nm, pico de Plasmón a 425 nm) es típica para las nanopartículas de plata. El pico de Plasmón y el ancho total de la mitad del máximo (FWHM) depende del grado de agregación coloidal ⁸⁶. En este estudio, la resonancia del plasmón de superficie por espectrometría UV-visible de metal mostró un pico fuerte a 425 nm confirmando la formación de nanopartículas de plata.

En el 2010 Carroll *et al.* ⁶⁹ sintetizaron nanopartículas de Fe y Ag, core /Shell por síntesis química y llevaron a cabo la caracterización de material. Ellos utilizaron FeSO₄, AgNO₃ y NaBH₄ como agente reductor. En la figura 39 del ANEXO se muestra que los valores de la absorción de las Ag-NPs son coherentes con lo reportado por la literatura ya mencionada. En este caso, las nanopartículas sintetizadas que se muestran en la figura 3 coinciden con el

espectro de absorción Ag/ Fe Core Shell, indicando que en la capa superficial está el Fe y en el núcleo la Ag al no observarse la absorbancia característica del plasmón superficial de la plata.

El análisis FTIR se llevó a cabo para identificar las posibles biomoléculas responsables de la reducción de nanopartículas de Ag y Fe y el recubrimiento de las nanopartículas de Ag-Fe bio-reducidas por el extracto además de observar si las NPs obtenidas poseen compuestos orgánicos adheridos que las estabilicen estéricamente.

Los espectros FTIR de nanopartículas de Ag / Fe sintetizadas con *Gardenia jasminoides* que se muestran en la Figura 4 coinciden con los estudios llevados a cabo por Naseem *et.al.*⁸³, en donde se observa que se encuentran los mismos picos de absorción que en las NPs, indicando que las anteriores están cubiertas por el extracto con el que se sintetizaron, actuando como agente reductor y estabilizador en la síntesis de nanopartículas.

Estos picos sugirieron la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos en el extracto de *Gardenia jasminoides*, moléculas orgánicas previamente reportadas en la composición del género *Gardenia*⁸⁷. La presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en el extracto podría ser responsable de la reducción de iones metálicos y la formación de las correspondientes nanopartículas metálicas.

Algunos datos de la utilización de extractos de plantas en la síntesis de nanopartículas como su medición en FTIR sugieren que los alquenos, alcanos, alquinos, alcoholes, fenoles y aminas podrían desempeñar papeles activos en la reducción foto-inducida de iones de metales. Algunos o la

combinación de los enlaces C-H, C-O, C = O, C = C, C-N, N-H y O-H parecen desempeñar papeles importantes en la reducción de iones de plata en extractos de hojas de higuera ⁸⁸, por ejemplo.

También se ha reportado que utilizando extractos como el de cáscara de banana, los diferentes grupos funcionales carboxilo, hidroxilo y amida pueden participar en el proceso de síntesis de nanopartículas de plata y a su vez, estabilizarlas ⁸⁹, esto al comprobar con el FTIR que los grupos funcionales del extracto y las NPs coinciden al igual que nuestras nanopartículas con su respectivo extracto.

Al realizar la espectroscopia RAMAN, se obtienen picos de absorbancia entre 1300 y 1500 cm^{-1} , los cuales son característicos de anillos aromáticos, lo cual se relaciona con la absorbancia observada en el espectro IR ⁹⁰.

Ruiz *et al.* ⁷⁰ sintetizaron nanopartículas bimetálicas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ por vía química indicando que el hierro se oxida en el momento de la reducción de la plata. Se obtuvieron nanopartículas en promedio de 20 nm como se muestra en la Figura 40 a-c (ANEXO) en donde se visualizan nanopartículas bimetálicas en micrografías de Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución en comparación con las sintetizadas en este proyecto (d), donde podemos visualizar la similitud en morfología.

Respecto al patrón XRD que se mostró en la Figura 7, que no son distintivos los picos de difracción ($2\theta = 10^\circ \sim 90^\circ$), especialmente el pico característico de hierro cero-valente ($\alpha\text{-Fe}$) a $2\theta = 44.9^\circ$. Existen dos explicaciones posibles para este resultado: que el contenido de Fe era

insuficiente, o que las nanopartículas eran amorfas. Sin embargo, el contenido de Fe detectado en el espectro de EDS fue del 41.40 % (Fig. 36). Entonces las NPs son principalmente de naturaleza amorfa, lo que coincide con lo reportado por Wei *et al.* En su investigación de síntesis de nanopartículas de Fe utilizando extracto de *Eichhornia crassipes* para su reducción ⁷¹.

Respecto a las aplicaciones de este tipo de materiales, las Ag-NPs han sido ampliamente estudiadas como antimicrobianos ^{86,91,92}. Sin embargo, el uso del hierro ha tenido otro tipo de enfoques, lo que hace relevante la combinación de estos dos metales.

El hierro es utilizado principalmente en el tema de remediación. Devatha *et al* ⁶⁸ sintetizaron nanopartículas de hierro usando diferentes extractos por síntesis biológica para el tratamiento de aguas residuales domésticas. La prueba experimental de remoción de fosfatos indicó una alta capacidad de las nanopartículas sintetizadas de eliminar los fosfatos de las aguas residuales domésticas.

En otro estudio Wei *et al.* ⁷¹ sintetizaron con éxito NPs de hierro utilizando extracto de *Eichhornia* con el objetivo de remover Cr (VI) y los resultados indicaron que Cr (VI) era reducido a Cr (III) por las NPs con alta eficiencia.

Sharma *et al.*⁶² sintetizaron nanopartículas bimetálicas Fe-Ag con el objetivo de remover fosfatos del agua e inactivar microorganismos. En este estudio se demostró que las nanopartículas bimetálicas son capaces de remover el fosfato del agua. Sin embargo, la plata no desempeña un efecto análogo en la eliminación de éste.

En el tema de inactivar los microorganismos, estas nanopartículas se probaron contra 9 microorganismos, los valores de concentración mínima inhibitoria se encontraban entre 100-500 g/L. en este caso de las muestras estudiadas los óxidos de hierro no mostraron efecto antimicrobiano y las nanopartículas Ag-Fe inhibieron significativamente el crecimiento de las bacterias estudiadas mostrando un efecto sinérgico al igual que nuestros resultados Figura 41 (ANEXO). Sin embargo, incluso a la concentración más alta empleada (es decir, 3,5 g / l), su estudio no mostró ninguna actividad antibacteriana y antifúngica contra todos los microorganismos incluidos en el estudio.

Se toma como referencia la reacción 4 reportada, ya que es la que tiene mayor similitud con los resultados de composición por EDS reportados para nuestras partículas bimetálicas como se muestra en la figura 9.

Estudios han demostrado que las NPs tienen una mayor actividad contra las bacterias Gram positivas que contra las bacterias Gram negativas, porque la pared celular de las bacterias Gram negativas está compuesta de LPS, lipoproteínas y fosfolípidos, que forman una barrera de penetración que permite la entrada de solo macromoléculas. Por el contrario, la pared celular de las bacterias Gram positivas incluye una capa “delgada” de peptidoglicano, así como ácido teicoico y abundantes poros que permiten que las moléculas extrañas penetren, lo que da como resultado el daño de la membrana celular y la muerte celular ⁹³.

Varios estudios confirman que las nanopartículas de hierro poseen buenas propiedades antimicrobianas. El efecto antibacteriano de

nanopartículas de óxido de hierro sintetizado usando el extracto de *Tridax Procumbens* (Fe_3O_4) fue investigado por Senthil y Ramesh ⁹⁴ frente a las bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*.

Para lograr los objetivos propuestos en el presente trabajo, se realizaron pruebas para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas de las cepas bacterianas utilizadas, obteniendo datos que no han sido reportados anteriormente utilizando la síntesis biológica y los microorganismos evaluados en este estudio.

Variaciones entre las concentraciones obtenidas en el presente estudio con las reportadas en la literatura se pueden atribuir al medio de cultivo que se utilizó en los experimentos ⁹⁵. Se ha reportado que, en medios complejos, como los son los medios utilizados en el presente estudio al componerse de fuentes complejas de carbono y nitrógeno, la concentración mínima inhibitoria puede aumentar ⁹⁶.

Lo anterior sin descartar que existen ciertas limitaciones en este tipo de investigaciones recopiladas por Wang *et al.* ¹⁴. Los mecanismos antibacterianos de las NPs aún no están claros. Por ejemplo, muchos estudios atribuyen la actividad antibacteriana al estrés oxidativo o ROS, mientras que, para otras NPs, como las NPs de MgO, el mecanismo antibacteriano puede no estar asociado con la regulación del metabolismo bacteriano. Por lo tanto, vale la pena abordar los mecanismos antibacterianos de las NPs en futuras investigaciones.

Otras limitaciones son la estructura compleja de la membrana celular bacteriana y la falta de enfoques de investigación para estudios in vitro.

En el tema antimicrobiano se puede resaltar que las CMI más bajas fueron para bacterias Gram negativas. Si bien, las bacterias Gram positivas debido a su composición permiten que las moléculas extrañas penetren y dañen la membrana celular, las Gram negativas tienen en su pared celular LPS, lípidos y porinas. Estas últimas pueden actuar como el transporte de las nanopartículas siendo los canales principales para el movimiento de moléculas extrañas hacia y desde el cuerpo de la célula bacteriana.

Aún hay muchas preguntas sin respuesta, como por ejemplo cómo las NPs cruzan la membrana celular bacteriana. La membrana de la célula bacteriana es a la vez una barrera y un canal para el movimiento hacia adentro y hacia afuera de las sustancias.

En las membranas de células bacterianas Gram negativas, las porinas, que generalmente permiten el paso de moléculas <600 Da, son los canales principales para el movimiento de moléculas extrañas hacia y desde el cuerpo de la célula bacteriana. Por lo tanto, el transporte de casi todas las NPs estará limitado a su tamaño. Sin embargo, ciertos estudiosos han propuesto que las porinas pueden mediar el paso de las NPs con diámetros en el rango de 1-9 nm a través de la membrana celular bacteriana ⁹⁷.

La endocitosis de bacterias, similar a lo que se observa para las células eucariotas, puede considerarse como otro mecanismo de movimiento de NPs ⁹⁸. Sin embargo, no se han presentado resultados sobre este tema. Actualmente, el mecanismo más razonable es que la exposición de las células bacterianas a concentraciones más bajas de NPs provocan la desintegración completa de las células y la eliminación de la capa de LPS,

que sobresale de la superficie de la célula en forma de vesículas. Tales protrusiones de membrana se unen a las NPs, que luego entran a la célula por atracción electrostática.

Además, los estudios que abordan los mecanismos inhibidores intracelulares siguen siendo limitados. El estrés oxidativo inducido por las NPs merece atención, y pocos estudios han considerado la acción de las NPs en la expresión génica, la síntesis de proteínas y el metabolismo de las células bacterianas.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden realizar las siguientes conclusiones:

- Es posible sintetizar nanopartículas bimetálicas con el extracto de la planta *Gardenia jasminoides* utilizando AgNO_3 y $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ como precursores de plata y hierro respectivamente.
- En las condiciones de reacción utilizadas se favorece la formación de partículas de tamaño nanométrico, obteniendo un tamaño promedio de 13 nm de diámetro, y de forma mayoritariamente esférica.
- Se puede evidenciar, con base en los datos proporcionados por FTIR y Espectroscopia RAMAN, que las NPs obtenidas se encuentran estabilizadas estéricamente por compuestos orgánicos provenientes del extracto utilizado en la síntesis.
- La morfología de las nanopartículas bimetálicas sugerida es núcleo/coraza al visualizarse en las micrografías del TEM de alta resolución.

- El EDS realizado indica que las BNPs contienen 41.40% de Fe y 58.59% de plata.
- Las Fe-NPs sintetizadas en este proyecto no tuvieron propiedades antibacterianas.
- Las BNPs mostraron un efecto sinérgico en la actividad antibacteriana al ser estudiadas contra las cepas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* resistente y *Candida albicans*.
- Las BNPs mostraron un efecto potenciador en la actividad antibacteriana al ser estudiadas contra las cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 11219.
- Las BNPs mostraron un efecto indiferente en la actividad antibacteriana al ser estudiadas contra las cepas: *Staphylococcus aureus* resistente, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 5007.
- En todos los casos la CMB fue el doble de la CMI de cada cepa estudiada.

Por último, se concluye que la utilización del extracto de *Gardenia jasminoides* como agente reductor para la síntesis verde de nanopartículas bimetálicas resulta ser una excelente opción para este fin, por lo que este trabajo abre nuevas posibilidades a las metodologías de síntesis verde para las distintas ramas de la ciencia con interés en la obtención de NPs.

CAPÍTULO 8

ANEXOS

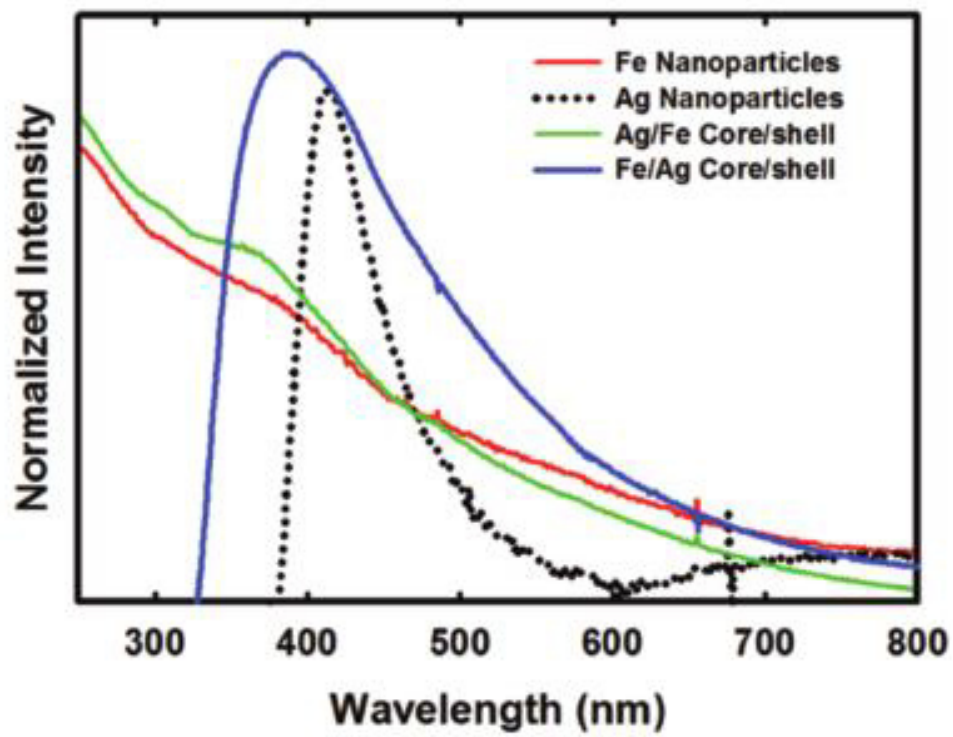


Figura 39. Espectro UV-Vis de síntesis química de Nanopartículas Bimetálicas Fe-Ag por Carroll *et al.*⁶⁹

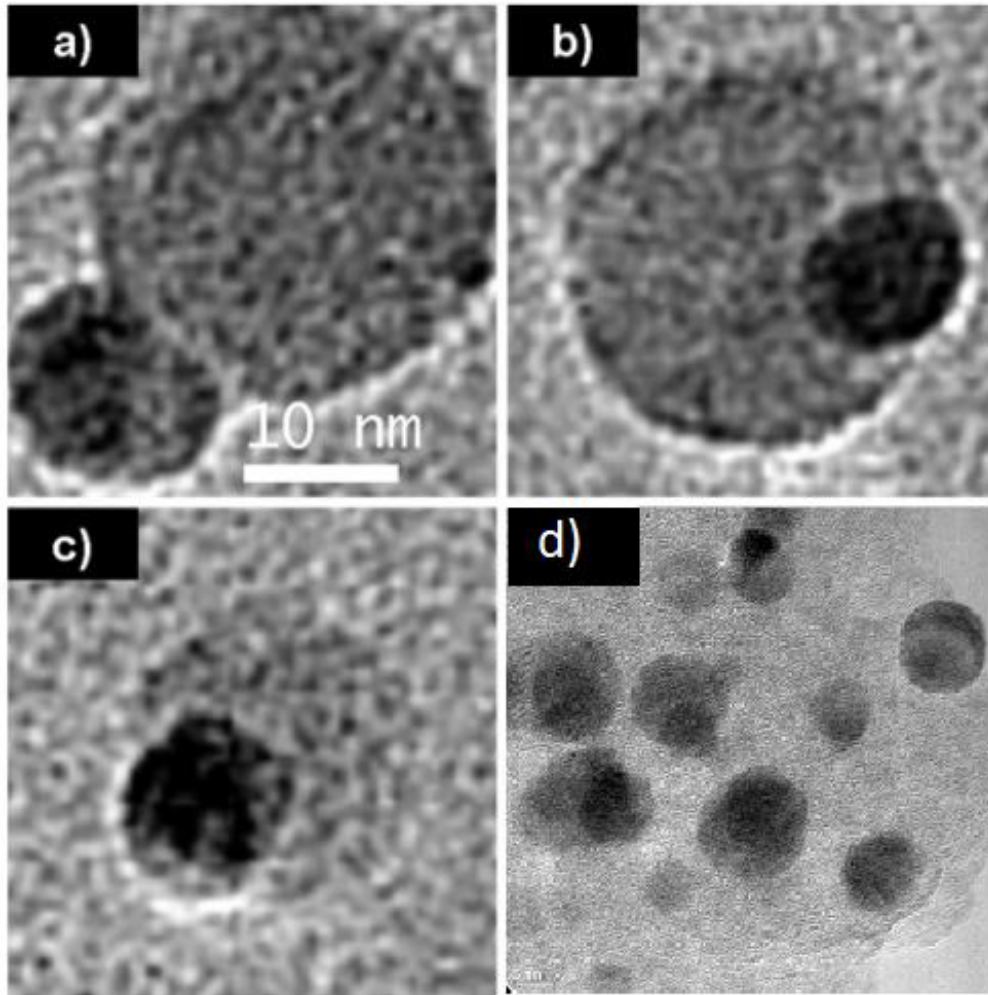


Figura 40. Nanopartículas bimetálicas en micrografías de Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (a-c) Ruiz *et al.*⁷⁰¹ en comparación con las sintetizadas en este proyecto (d), donde podemos visualizar su similitud en morfología.

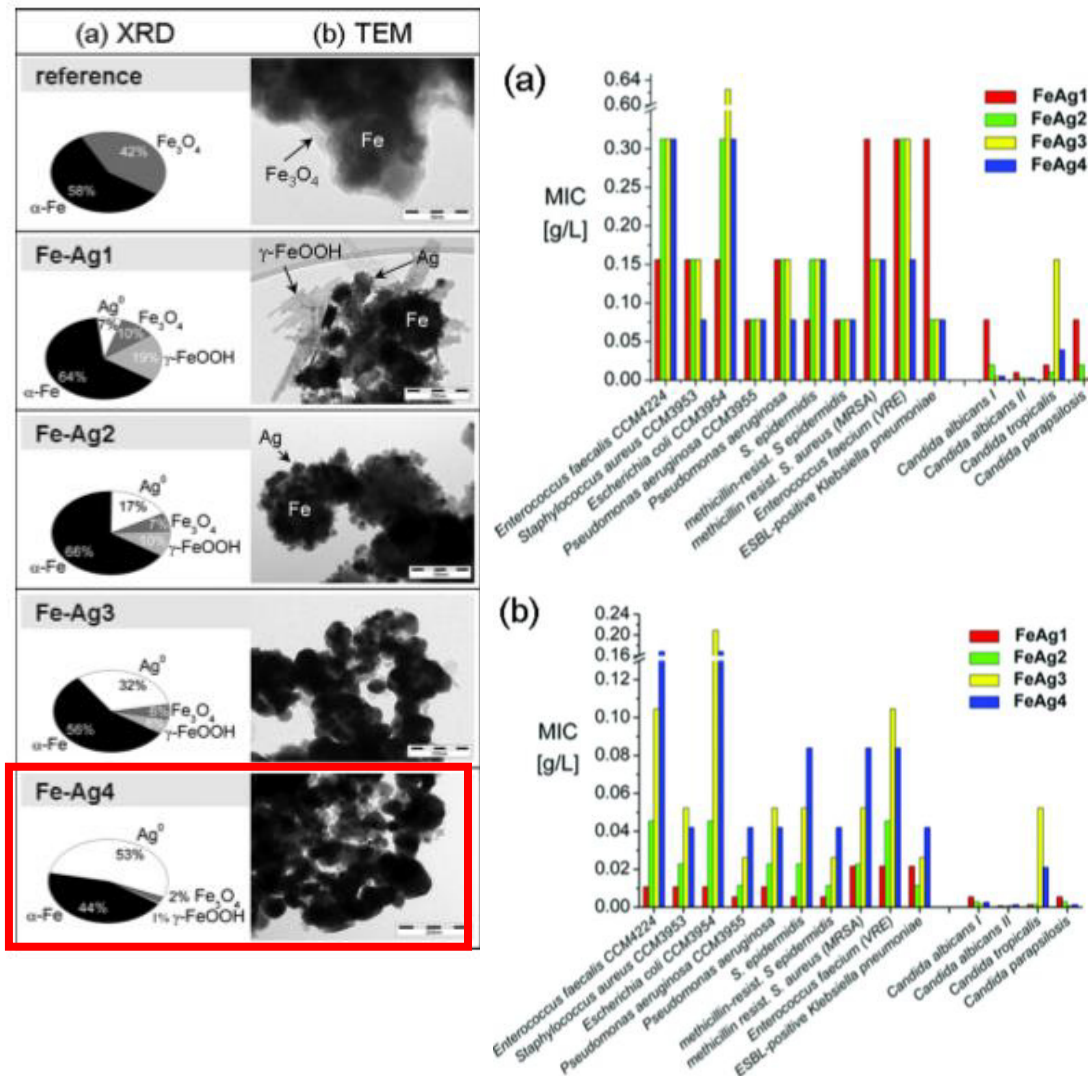


Figura 41. Nanopartículas bimetalicas Fe-Ag en diferentes concentraciones evaluados contra una amplia gama de microorganismos por Sharma *et al.*⁶².

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. *WHO* (2016). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es>. (Accessed: 29th September 2016)
2. Alós, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **33**, 692–699 (2015).
3. Rocha, C., Reynolds, N. D. & Simons, M. P. Resistencia emergente a los antibióticos: Una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud emerging antibiotic resistance: a global threat and critical healthcare problem. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* **32**, 139–145 (2015).
4. OMS | Resistencia a los antimicrobianos. *WHO* (2017).
5. Roberta J. Worthington Christian Melander. Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics. *The Journal of Organic Chemistry* **78**, 4207–4213 (2013).
6. Andersson, D. I. & Hughes, D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* **8**, 260–271 (2010).
7. López- Cerero, L. Papel del ambiente hospitalario y los equipamientos en la transmisión de las infecciones nosocomiales. *Enfermedades*

Infecciosas y Microbiología Clínica 6 (2013).

8. Weinstein, R. A. Epidemiology and control of nosocomial infections in adult intensive care units. *The American journal of medicine* **91**, 179S–184S (1991).
9. Pérez, D. A. *et al.* Infecciones relacionadas con la atención sanitaria en Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica / Infections related to health care in Pediatric Intensive Care Unit. *MediCiego* **21**, (2015).
10. Valencia, H. La nanotecnología en productos cotidianos. (2016). Available at: <http://www.conacytprensa.mx/index.php/tecnologia/nanotecnologia/10635-la-nanotecnologia-en-productos-cotidianos>. (Accessed: 3rd October 2016)
11. Ramanan Laxminarayan, D. Amenazas a la salud mundial en el siglo XXI. *Fianazas y Desarrollo* 19–20 (2014).
12. Morones, J. R., Yacaman, M. J., Elechiguerra, J. L. & Camacho, A. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346–2353 (2005).
13. Roopan, S. M., Surendra, T. V., Elango, G. & Kumar, S. H. S. Biosynthetic trends and future aspects of bimetallic nanoparticles and its medicinal applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**, 5289–5300 (2014).
14. Wang, L., Hu, C. & Shao, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine* **Volume 12**, 1227–1249 (2017).
15. Lobato García, C., Carbajal-Dominguez, A., Sosa Rojas, S. & Contactar, A. Síntesis de nanopartículas metálicas con un método de química verde. in *NanoMex'11. Encuentro Internacional e Interdisciplinario en Nanociencia y Nanotecnología* (2011).
16. Hsueh, P.-R. New Delhi Metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): An Emerging Threat Among Enterobacteriaceae. *Journal of the Formosan Medical Association* **109**, 685–687 (2010).
17. Poole, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance.

Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement **92**, 55S–64S (2002).

18. Pramanik, A., Laha, D., Bhattacharya, D., Pramanik, P. & Karmakar, P. A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **96**, 50–55 (2012).
19. Jayaraman, R. Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Current science* **96**, 1475–1484 (2009).
20. Knetsch, M. L. W. & Koole, L. H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers* **3**, 340–366 (2011).
21. Gurunathan, S. *et al.* Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 5901–5914 (2012).
22. Nagy, A. *et al.* silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *International Journal of Nanomedicine* **6**, 1833–1852 (2011).
23. Leung, Y. H. *et al.* Mechanisms of antibacterial activity of mgo: Non-ros mediated toxicity of mgo nanoparticles towards escherichia coli. *Small* **10**, 1171–1183 (2014).
24. Lemire, J. A., Harrison, J. J. & Turner, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 371–384 (2013).
25. Li, H., Chen, Q., Zhao, J. & Urmila, K. Enhancing the antimicrobial activity of natural extraction using the synthetic ultrasmall metal nanoparticles. *Scientific Reports* **5**, 1–13 (2015).
26. Armentano, I. *et al.* The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: A review. *Scientific World Journal* **2014**, (2014).
27. Gilmore, J. H. Nanoparticle Approaches against Bacterial Infections. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **6**, 532–

- 547 (2014).
28. Wang, H. *et al.* Multifunctional TiO₂ nanowires-modified nanoparticles bilayer film for 3D dye-sensitized solar cells. *Optoelectronics and Advanced Materials, Rapid Communications* **4**, 1166–1169 (2010).
 29. Xu, Y. *et al.* Exposure to TiO₂ nanoparticles increases Staphylococcus aureus infection of HeLa cells. *Journal of Nanobiotechnology* **14**, 34 (2016).
 30. Yang, W. *et al.* Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology* **20**, (2009).
 31. Li, Y., Zhang, W., Niu, J. & Chen, Y. Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* **6**, 5164–5173 (2012).
 32. Peng, Z. *et al.* Dual effects and mechanism of TiO₂ nanotube arrays in reducing bacterial colonization and enhancing C3H10T1 / 2 cell adhesion. *International Journal of Nanomedicine* 3093–3105 (2013). doi:10.2147/IJN.S48084
 33. Cheloni, G., Marti, E. & Slaveykova, V. I. Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Aquatic Toxicology* **170**, 120–128 (2016).
 34. Yu, J. *et al.* Synthesis, characterization, antimicrobial activity and mechanism of a novel hydroxyapatite whisker/nano zinc oxide biomaterial. *Biomedical Materials* **10**, 015001 (2014).
 35. Lesniak, A. *et al.* Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 1438–1444 (2013).
 36. Bharde, A. a. *et al.* Bacteria-Mediated Precursor Dependent Biosynthesis of Superparamagnetic Iron Oxide and Iron Sulfide Nanoparticles. *Langmuir* **24**, 5787–5794 (2008).
 37. Luo, F., Chen, Z., Megharaj, M. & Naidu, R. Biomolecules in grape leaf extract involved in one-step synthesis of iron-based nanoparticles. *RSC*

- Advances* **4**, (2014).
38. Moon, J.-W. *et al.* Large-scale production of magnetic nanoparticles using bacterial fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **37**, 1023–1031 (2010).
 39. Makarov, V. V. *et al.* 'Green' nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green chemistry of the Royal Society of Chemistry* **13**, 2638–2650 (2011).
 40. Saif, S., Tahir, A. & Chen, Y. Green Synthesis of Iron Nanoparticles and Their Environmental Applications and Implications. *Nanomaterials* **6**, 209 (2016).
 41. Herrera-Becerra, R., Zorrilla, C., Rius, J. L. & Ascencio, J. A. Electron microscopy characterization of biosynthesized iron oxide nanoparticles. *Applied Physics A* **91**, 241–246 (2008).
 42. Krutyakov, Y. A., Olenin, A. Y., Kudrinskii, A. A., Dzhurik, P. S. & Lisichkin, G. V. Aggregative stability and polydispersity of silver nanoparticles prepared using two-phase aqueous organic systems. *Nanotechnologies in Russia* **3**, 303–310 (2008).
 43. Nouailhat, A. *An Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*. (ISTE Ltd and John Wiley & Sons, Inc).
 44. Pillai, S. *et al.* Evaluation of *E. coli* inhibition by plain and polymer-coated silver nanoparticles. *Journal of the São Paulo Institute of tropical Medicine Revista do*, (2018).
 45. Sodagar, A. *et al.* Effect of TiO₂ nanoparticles incorporation on antibacterial properties and shear bond strength of dental composite used in Orthodontics. *Dental Press Journal of Orthodontics* **22**, 67–74 (2017).
 46. Hasmaliza, M., Foo, H. S. & Mohd, K. Anatase as Antibacterial Material in Ceramic Tiles. *Procedia Chemistry* **19**, 828–834 (2016).
 47. Garza-Cervantes, J. A. *et al.* Synergistic antimicrobial effects of silver/transition-metal combinatorial treatments. *Scientific Reports* **7**, (2017).
 48. Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent:

- a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* **275**, 177–182 (2004).
49. Chou, K.-S. & Chen, C.-C. Fabrication and characterization of silver core and porous silica shell nanocomposite particles. *Microporous and Mesoporous Materials* **98** 208–213 (2006).
 50. G. M. Nazeruddin*, R. N. Prasad, Y. I. S. and A. A. S. 129 Scholar Research Library Synergetic effect of Ag-Cu bimetallic nanoparticles on antimicrobial activity. *Der Pharmacia Lettre* **6**, 129–136 (2014).
 51. Banerjee, M., Sharma, S., Chattopadhyay, A. & Ghosh, S. S. Enhanced antibacterial activity of bimetallic gold-silver core-shell nanoparticles at low silver concentration. *Nanoscale* **3**, 5120 (2011).
 52. Nanoalloys, S. C., Taner, M., Sayar, N., Yulug, I. G. & Suzer, S. Zn Prolongs the Stability of Antibacterial Silver-Copper Nanoalloys. *Biochemistry and Biophysics* **1**, 70–77 (2013).
 53. Bahrami, K. *et al.* Hydroxyl capped silver-gold alloy nanoparticles: characterization and their combination effect with different antibiotics against *Staphylococcus aureus* Hydroxyl capped silver-gold alloy nanoparticles. *Nanomedicine Journal* **1**, 155–161 (2013).
 54. Jebali, A., Ramezani, F. & Kazemi, B. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Geotricum* sp. *Journal of Cluster Science* **22**, 225–232 (2011).
 55. Lin, K. S., Chang, N. Bin & Chuang, T. D. Fine structure characterization of zero-valent iron nanoparticles for decontamination of nitrites and nitrates in wastewater and groundwater. *Science and Technology of Advanced Materials* **9**, (2008).
 56. Gong, P. *et al.* Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄ @Ag nanoparticles. *Nanotechnology* **18**, 285604 (2007).
 57. Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D. & Surampalli, R. Y. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere* **82**, 489–494 (2011).
 58. Marková, Z. *et al.* Air Stable Magnetic Bimetallic Fe–Ag Nanoparticles for Advanced Antimicrobial Treatment and Phosphorus Removal.

- Environmental Science & Technology* **47**, 5285–5293 (2013).
59. Manahan, S. E. *Green Chemistry and the Ten Commandments of Sustainability*. (ChemChar Research, Inc, 2006).
 60. Hoag, G. E. *et al.* Degradation of bromothymol blue by ‘greener’ nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols. *Journal of Materials Chemistry* **19**, 8671 (2009).
 61. Shahwan, T. *et al.* Green synthesis of iron nanoparticles and their application as a Fenton-like catalyst for the degradation of aqueous cationic and anionic dyes. *Chemical Engineering Journal* **172**, 258–266 (2011).
 62. Sharma, V. K., Siskova, K. M. & Zboril, R. Magnetic bimetallic Fe/Ag nanoparticles: Decontamination and antimicrobial agents. *ACS Symposium Series* **1150**, 193–209 (2013).
 63. Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B. & Možina, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* **81**, 121–126 (2010).
 64. Sheikholeslami, S. *et al.* Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles and Their Combination with *Zataria multiflora* Essential Oil and Methanol Extract. *Jundishapur Journal of Microbiology* **9**, (2016).
 65. Covarrubias, C., Trepiana, D. & Corral, C. Synthesis of hybrid copper-chitosan nanoparticles with antibacterial activity against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Dental Materials Journal* (2018). doi:10.4012/dmj.2017-195
 66. Habash, M. B. *et al.* Potentiation of Tobramycin by Silver Nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **61**, (2017).
 67. Fakhri, A., Tahami, S. & Naji, M. Synthesis and characterization of core-shell bimetallic nanoparticles for synergistic antimicrobial effect studies in combination with doxycycline on burn specific pathogens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **169**, 21–26 (2017).
 68. Devatha, C. P., Thalla, A. K. & Katte, S. Y. Green synthesis of iron

- nanoparticles using different leaf extracts for treatment of domestic waste water. *Journal of Cleaner Production* **139**, 1425–1435 (2016).
69. Carroll, K. J. *et al.* One-pot aqueous synthesis of Fe and Ag core/shell nanoparticles. *Chemistry of Materials* **22**, 6291–6296 (2010).
 70. Esparza, R., Pérez, R. & Rosas, G. Structural Characterization of Fe-Ag Bimetallic Nanoparticles Synthesized by Chemical Reduction. *International Research Journal of Pure & Applied Chemistry* **4**, 263–269 (2014).
 71. Wei, Y., Fang, Z., Zheng, L. & Tsang, E. P. Biosynthesized iron nanoparticles in aqueous extracts of *Eichhornia crassipes* and its mechanism in the hexavalent chromium removal. *Applied Surface Science* **399**, 322–329 (2017).
 72. Ulug, B., Haluk Turkdemir, M., Cicek, A. & Mete, A. Role of irradiation in the green synthesis of silver nanoparticles mediated by fig (*Ficus carica*) leaf extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **135**, 153–161 (2015).
 73. Rasband, W. Software ImageJ. National Institutes of Health, USA.
 74. Wikler, M. A. & Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard*. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006).
 75. American Society for Microbiology. *Manual of antimicrobial susceptibility testing. Manual of antimicrobial susceptibility testing* (2005). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
 76. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 5–16 (2001).
 77. Garza-Cervantes, J. A. *et al.* Synergistic Antimicrobial Effects of Silver/Transition-metal Combinatorial Treatments. *Scientific Reports* **7**, 903 (2017).
 78. Naseem, T. & Farrukh, M. A. Antibacterial Activity of Green Synthesis of Iron Nanoparticles Using *Lawsonia inermis* and *Gardenia jasminoides* Leaves Extract. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry*

2015, 7 (2015).

79. Palanisamy, N. K. *et al.* Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Nanobiotechnology* **12**, 7 (2014).
80. Singh, P. P. & Bhakat, C. Green Synthesis of Gold Nanoparticles and Silver Nanoparticles from Leaves and Bark of *Ficus Carica* for Nanotechnological Application. *International Journal of Scientific and Research Publications* **2**, 1–4 (2012).
81. Kulkarni, V. D. & Kulkarni, P. S. Green Synthesis of Copper Nanoparticles Using *Ocimum Sanctum* Leaf Extract. *International Journal of Chemical Studies* **1**, 2321–4902 (2013).
82. Manikprabhu, D., Lingappa, K. & Fanizzi, F. P. Microwave Assisted Rapid and Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using a Pigment Produced by *Streptomyces coelicolor* kImp33. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **5**, (2013).
83. Naseem, T. & Farrukh, M. A. Antibacterial Activity of Green Synthesis of Iron Nanoparticles Using *Lawsonia inermis* and *Gardenia jasminoides* Leaves Extract. *Journal of Chemistry* **2014**, 1–7 (2014).
84. Pattanayak, M. & Nayak, P. L. Green Synthesis and Characterization of Zero Valent Iron Nanoparticles from the Leaf Extract of *Azadirachta indica* (Neem). *World Journal of Nano Science & Technology* **2**, 6–9 (2013).
85. Dasaria, P. K., Jangra, M. K., Gupta, A. & Singh, S. K. International Journal of Institutional. *Pharmaceutical Sciences* **4**, 83–91 (2014).
86. Namratha, N. & Monica P V. Synthesis of silver Nanoparticles using *Azadirachta indica* (Neem) extract and usage in water purification. *Asian Journal Pharmacy Technology* **3**, 170–174 (2013).
87. Parmar, V. S. & Sharma, S. K. Novel Constituents of *Gardenia* Species - A Review. *Journal of Scientific & Industrial Research* **59**, 893–903 (2000).
88. Ulug, B., Haluk Turkdemir, M., Cicek, A. & Mete, A. Role of irradiation in the green synthesis of silver nanoparticles mediated by fig (*Ficus carica*) leaf extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular*

- Spectroscopy* **135**, 153–161 (2015).
89. Ibrahim, H. M. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **8**, 265–275 (2015).
 90. University of Toronto. RAMAN Band Correlation Table. (2010).
 91. Arunachalam, K. D., Annamalai, S. K. & Hari, S. One-step green synthesis and characterization of leaf extract-mediated biocompatible silver and gold nanoparticles from *Memecylon umbellatum*. *International journal of nanomedicine* **8**, 1307–15 (2013).
 92. Reddy Banala, R., Nagati, V. B. & Reddy Karnati, P. Green synthesis and characterization of *Carica papaya* leaf extract coated silver nanoparticles through X-ray diffraction, electron microscopy and evaluation of bactericidal properties. *Saudi Journal of Biological Sciences* **22**, 637–644 (2015).
 93. Sarwar, A., Katas, H., Samsudin, S. N. & Zin, N. M. Regioselective Sequential Modification of Chitosan via Azide-Alkyne Click Reaction: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives and Nanoparticles. *PLoS ONE* **10**(4): e0123084. (2015). doi:10.1371/journal.pone.0123084
 94. Senthil, M. Ramesh, C. Biogenic Synthesis of Fe₃O₄ NPs using *Tridax Procumbens* Leaf and Its antibacterial activity on *Pseudomonas auruginosa*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **7**, 1655–1660 (2012).
 95. Lee, L. J., Barrett, J. A. & Poole, R. K. Genome-Wide Transcriptional Response of Chemostat-Cultured *Escherichia coli* to Zinc. *Journal of bacteriology* **187**, 1124–1134 (2005).
 96. Brocklehurst, K. R. & Morby, A. P. Metal-ion tolerance in *Escherichia coli* : analysis of transcriptional profiles by gene-array technology. *Microbiology* **146**, 2277–2282 (2000).
 97. Neal, A. L. What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions

about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology* **17**, 362–371 (2008).

98. Lai, H.-Z., Chen, W.-Y., Wu, C.-Y. & Chen, Y.-C. Potent Antibacterial Nanoparticles for Pathogenic Bacteria. *ACS Applied Materials & Interfaces* **7**, 2046–2054 (2015).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Ana Lucía Padilla Cruz
Candidata para el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Tesis: BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS BIMETÁLICAS (Ag-Fe),
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES
BACTERICIDAS

Edad: 26 años

Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Procesos
Microbiológicos.

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 9 de diciembre de 1991, hija de Héctor Padilla Gloria y Delia Margarita Cruz Cárdenas.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Farmacéutico Biólogo en el 2014.